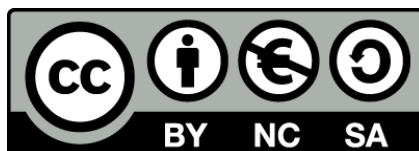




UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Alteraciones en la señalización de FGF21 asociadas a la terapia antirretroviral y a la adiposidad

Ricardo Moure Ortega



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Grupo de Genética y Biología Molecular
de Proteínas Mitocondriales
y Patologías Asociadas

Departamento de Bioquímica y Biomedicina Molecular
Facultad de Biología

Programa de Doctorado en Biotecnología

Alteraciones en la señalización de FGF21 asociadas a la terapia antirretroviral y a la adiposidad

Memoria presentada por

Ricardo Moure Ortega

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

Firma de los directores

Marta Giralt Oms
(Directora)

Francesc Villarroya
Gombau
(Co-director)

Barcelona, 2017

No quiero escribir estos agradecimientos. Me obligan. No me obligan directamente, pero la pila de tesis que hay en las estanterías del TAM1 está llena de páginas de berborrea emocional descontrolada y no quiero parecer el desgraciado del laboratorio.

Simplemente, no me gustan las expresiones de sentimientos abiertas y públicas, me hacen sentir como cuando alguien te habla demasiado cerca o como cuando las amigas de mi abuela me daban besos de pequeño. No quiero que nadie piense que soy un robot, un desalmado o un reprimido. Yo también tengo sentimientos: a veces me duele la barriga, me pica donde no puedo me rascar en público o me entra un deseo irrefrenable de morder los geles de agarosa.

Así que me he bebido tres cervezas para hacer como la muchacha de Frozen y “leritgolear” mis sentimientos, porque ninguna tesis se hace sola, pero tampoco se hace solo, y menos en el TAM.

Yo siempre he sido uno de esos del “y si...”, una de esas personas que se preguntan continuamente por lo que hubiera pasado si hubiera tomado uno u otro camino en la vida. Pienso en que en alguno de los miles de millones de universos paralelos que existen ese camino sí que se tomó. En un universo no decidí en el último momento cogerme física y matemáticas en segundo de bachillerato y no me quedé a una centésima de entrar en medicina, ahora soy psiquiatra, tengo tiempo para hacer deporte y no parece que mi cuerpo esté hecho de donetes. Hay otro universo en el que sí que me regalaron esa cocinita por Reyes y ahora tengo un programa con Chicote en el que paso trozos de pan por los rincones más asquerosos de los restaurantes y animo a los propietarios a comérselos.

En este universo hago monólogos de ciencia, he trabajado con Buenafuente, la Reina Letizia me ha llamado adipocito y he hablado con ella sobre comer bocadillos de donetes. Creo que este universo es de los buenos.

En este universo siempre tengo la suerte de aterrizar donde me toca. Para la tesis no podía hacer una excepción... Es difícil describir lo que supone trabajar en el TAM. A nadie le es indiferente estar aquí y, aunque nos parezca lo normal, todos sabemos que este lugar es especial. Que en pocos sitios tantas personas tan distintas, y a la vez tan iguales, pueden formar un equipo basado en la amistad, en el que sabemos lo que hace el otro, lo que necesita y lo que le puede ayudar. En el que en el despacho de los jefes vas a encontrar un consejo sabio, un apoyo y una voz amiga en la misma frase; como si tus directores de tesis fueran Dumbledore y la profesora McGonagall. Un lugar en el que sabemos ver cuando alguien está “flojito” o cuando ha entrado en un callejón sin salida. En el que la mejor forma de encontrar respuestas cuando estamos perdidos son unas cervezas y unas patatas sabor berberecho. No hay lugares como este, pero los habrá. Porque así debería ser la ciencia: colaboración, fraternidad, amistad... Porque cuando se trata de crear, de imaginar y de soñar, uno más uno suman más de dos.

Por eso creo que este laboratorio es como si se hubiera abierto un agujero espacio-temporal que hubiera atraído a las personas que más necesitas tener a tu lado en cada momento, un puzzle de infinitas piezas que sólo encajan cuando están todas juntas, como la isla de “Perdidos” pero haciendo real-times y con “Voleu gel” en vez de humo negro.

Por eso quiero daros las gracias a todos y a cada uno de vosotros: gracias, gracias y gracias por haber estado allí cuando lo he necesitado.

Gracias a todos vosotros por apoyarme y enseñarme.

Gracias a mi familia por crearme y a Álvaro por aguantarme.

Gracias al multiverso por no dejarme entrar en medicina.

The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not "Eureka!" but "That's funny ..."
— Isaac Asimov

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	11
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	15
BLOQUE I – BIOLOGÍA DEL TEJIDO ADIPOSO	17
1. ANATOMÍA DEL TEJIDO ADIPOSO	17
1.1. Tipos de tejido adiposo	18
1.1.1. El tejido adiposo blanco	18
1.1.2. El tejido adiposo marrón	18
1.1.3. El tejido adiposo beige o <i>brite</i>	19
1.2. La distribución del tejido adiposo	21
1.2.1. Distribución del tejido adiposo en ratón	21
1.2.2. Distribución del tejido adiposo en humanos	22
2. FUNCIONES DEL TEJIDO ADIPOSO	24
2.1. Funciones del tejido adiposo blanco	24
2.1.1. Síntesis de triglicéridos	26
2.1.2. Lipólisis	27
2.1.3. El tejido adiposo blanco como órgano secretor	29
2.1.3.1. Leptina	29
2.1.3.2. Adiponectina	30
2.1.3.3. Resistina	30
2.2. Funciones del tejido adiposo marrón	31
2.2.1. Fisiología de la termogénesis adaptativa	32
2.2.1.1. Respuestas aguda y crónica al frío	32
2.2.1.2. Activación de la termogénesis por estímulos β -adrenérgicos	33
2.2.1.3. El mecanismo de producción de calor en los adipocitos	34
3. EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO	35

3.1. Fase de determinación de linaje	36
3.2. Diferenciación de los adipocitos blancos	38
3.3. Diferenciación de los adipocitos marrones	39
3.4. Diferenciación de los adipocitos beige	40
BLOQUE II – FIBROBLAST GROWTH FACTOR-21	43
1. LA FAMILIA DE LOS FGFs	43
2. CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LOS FGFs	45
2.1. Clasificación funcional de los FGFs	45
2.1.1. Intracrinós	45
2.1.2. Paracrinós	45
2.1.3. Endocrinós	46
2.2. Los receptores de los FGFs	46
2.3. Los correceptores de los FGFs	47
2.3.1. Los proteoglicanos	47
2.3.2. El cofactor β -Klotho	48
3. FIBROBLAST GROWTH FACTOR-21 (FGF21)	49
3.1. Regulación de la producción de FGF21 en el hígado	50
3.1.1. Inducción de FGF21 durante el ayuno	50
3.1.2. Comunicación entre el hígado y el tejido adiposo marrón	52
3.1.3. Efectos farmacológicos de FGF21 sobre el hígado	52
3.2. Efectos y regulación de FGF21 en el tejido adiposo blanco	53
3.2.1. Sobre el metabolismo de la glucosa	53
3.2.2. Sobre el metabolismo lipídico	54
3.2.3. Sobre la producción y secreción de adipoquinas	55
3.3. Efectos de FGF21 sobre el tejido adiposo marrón	55
3.4. Efectos de FGF21 sobre el <i>browning</i>	56
3.5. Estados de resistencia a FGF21 en patologías metabólicas	57

BLOQUE III – EFECTOS DE LA INFECCIÓN POR VIH Y SU TRATAMIENTO SOBRE EL TEJIDO ADIPOSEO	59
1. LAS LIPODISTROFIAS	59
1.1. Clasificación y tipos	59
1.2. Fisiopatología de las lipodistrofias	60
1.3. Lipodistrofia asociada a la infección por VIH y al tratamiento antirretroviral	61
2. FISIOPATOLOGÍA Y CICLO DE VIDA DEL VIH	62
2.1. Infección por el virus del VIH	62
2.2. La terapia HAART	64
2.2.1. Clasificación de los fármacos de la terapia HAART	65
3. LA LIPODISTROFIA ASOCIADA A LA INFECCIÓN POR EL VIH Y A LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL	66
3.1. Sintomatología de la HALS	66
3.2. Bases moleculares de la HALS	68
3.2.1. Alteraciones en la adipogénesis	68
3.2.2. Toxicidad mitocondrial	69
3.2.3. Efectos producidos por la propia infección	70
3.2.4. Inflamación del tejido adiposo	70
3.2.5. Senescencia celular	71
3.2.6. Estrés de retículo endoplasmático	71
3.3. Los nuevos fármacos y la necesidad de seguir investigando	72
BLOQUE IV – EL ESTRÉS DE RETÍCULO	74
1. EL MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS DE PROTEINAS	74
1.1. La <i>Unfolded Protein Response</i>	74
1.1.1. La ruta de PERK – eIF2 α	75
1.1.2. La ruta de IRE1 α – XBP1	76
1.1.3. La ruta de ATF6	77

1.2. Estrés de retículo y apoptosis	77
2. EL ESTRÉS DE RETÍCULO EN LAS PATOLOGÍAS METABÓLICAS	78
2.1. Estrés de retículo y resistencia a la insulina en el hígado	79
2.2. Estrés de retículo y resistencia a la insulina en el tejido adiposo	79
2.3. Estrés de retículo y resistencia a la insulina en el músculo esquelético	80
2.4. Estrés de retículo y sistema FGF21/ β -Klotho	80
2. OBJETIVOS	83
3. INFORME DE LOS DIRECTORES	87
4. PUBLICACIONES	91
- <i>The Molecular Signature of HIV-1-Associated Lipomatosis Reveals Differential Involvement of Brown and Beige/Brite Adipocyte Cell Lineages</i>	93
- <i>Impact of elvitegravir on human adipocytes: Alterations in differentiation, gene expression and release of adipokines and cytokines</i>	113
- <i>Effects of antiretroviral drugs used in HIV infection on the fibroblast growth factor-21/β-Klotho system</i>	125
- <i>The levels of β-Klotho determine the thermogenic responsiveness of adipose tissues: involvement of the autocrine action of FGF21</i>	167
- <i>The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes</i>	203
5. DISCUSIÓN	239
6. CONCLUSIONES	269
7. BIBLIOGRAFÍA	273
8. ANEXOS	309
<i>Involvement of endoplasmic reticulum stress in the resistance to fibroblast growth factor-21 in obesity (Póster)</i>	311

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNmt: ADN mitocondrial

ADR β 3: *adrenoreceptor- β -3* (receptor β 3 adrenérgico)

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

AMPK: proteína quinasa activada por AMP

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATP: adenosín trifosfato

ATF: factor de transcripción activador

ATGL: *adipose triglyceride lipase* (lipase de triglicéridos adiposa)

ATV: atazanavir

AZT: zidovudina

BH: *buffalo hump* (giba de búfalo)

BMI: *body mass index* (índice de masa corporal)

C/EBP: *CCAAT-enhancer-binding protein*

CHOP10: *C/EBP homologous protein 10* (proteína homóloga de C/EBP 10)

CRE: *cAMP response element* (elemento de respuesta a AMPc)

CREB: *cAMP response element-binding protein* (proteína de unión a elemento de respuesta a AMPc)

D4T: estavudina

DMSO: dimetil sulfoxido

DPM: destellos por minuto

EFV: efavirenz

EI: *entrance inhibitor* (inhibidor de la entrada)

ELV: elvitegravir

ER: *endoplasmic reticulum* (retículo endoplasmático)

ERK: *extracellular signal-regulated kinases* (quinasas reguladas por señales extracelulares)

FA: *fatty acid* (ácido graso)

FFA: *free fatty acid* (ácido graso libre)

FABP4: *fatty acid binding protein 4* (proteína de unión a ácidos grasos 4)

FGF: *fibroblast growth factor* (factor de crecimiento de fibroblastos)

FGFR: *fibroblast growth factor receptor* (receptor de factores de crecimiento de fibroblastos)

GLUT1: *glucose transporter 1* (transportador de glucosa 1)

GLUT4: *glucose transporter 4* (transportador de glucosa 4)

GPR120: *G-protein coupled receptor 120* (receptor acoplado a proteína G 120)

HAART: *highly active antiretroviral therapy* (terapia antirretroviral de alta actividad)

HALS: *HIV-1/HAART-associated lipodystrophy syndrome* (síndrome lipodistrófico asociado al VIH y a la terapia antirretroviral de alta actividad)

HSL: *hormone sensitive lipase* (lipasa sensible a hormonas)

HSPA5: *heat shock protein family A (Hsp70) member 5*

HZ: *heterozygote* (heterocigoto)

IL: interleuquina

INSTI: *integrase inhibitor* (inhibidor de la integrasa)

KLB: β -Klotho

KO: *knock-out*

LPV: lopinavir

LPV/r: lopinavir/ritonavir

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase* (Proteína quinasa activada por mitógenos)

MCP1: *monocyte chemoattractant protein-1* (proteína quimiotáctica de monocitos 1)

MRV: maraviroc

MSCs: *mesenchymal stem cells* (células madre mesenquimales)

Myf5: *mitogenic factor-5* (factor mitogénico 5)

NA: noradrenalina

NBL: *non-BH lipomas* (lipomas no BH)

ND: *non-detected* (no detectado)

NE: norepinefrina

NEFA: *non-esterified fatty acid* (ácido graso no esterificado)

NFV: nelfinavir

NRTI: *nucleoside analog reverse-transcriptase inhibitor* (inhibidor de la transcriptase reversa análogo de nucleósido)

NNRTI: *non-nucleoside analog reverse-transcriptase inhibitor* (inhibidor de la transcriptase reversa no análogo de nucleósido)

NVP: nevirapina

PGC1 α : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*

PI: *protease inhibitor* (inhibidor de proteasa)

PKA: proteína quinasa A

PPAR: *Peroxisome proliferator-activated receptor*

RAL: raltegravir

ROS: *reactive oxygen species* (especies reactivas de oxígeno)

ROSI: rosiglitazona

RPV: rilpivirina

RTV: ritonavir

SGBS: *Simpson-Golabi-Behmel syndrome*

TAB: tejido adiposo blanco

TAM: tejido adiposo marrón

TDF: tenofovir difumarato

TG: triglicérido

THAP: thapsigargina

TNF: *tumour necrosis factor* (factor de necrosis tumoral)

TUN: tunicamicina

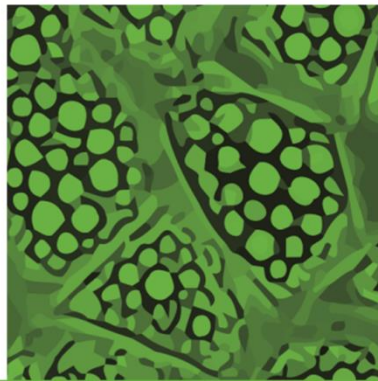
UCP: *uncoupling protein* (proteína desacoplante)

UPR: *unfolded protein response*

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirido

WT: *wild-type* (genotipo silvestre)



1. Introducción

BLOQUE I – BIOLOGÍA DEL TEJIDO ADIPOSO

1. ANATOMÍA DEL TEJIDO ADIPOSO

Hasta hace no mucho tiempo, el tejido adiposo había sido considerado poco más que un compartimento donde almacenar las reservas de energía para poder enfrentarse a periodos de escasez de alimentos y cumplir con las necesidades metabólicas del organismo. Sin embargo, las investigaciones llevadas a cabo durante las dos últimas décadas han hecho que el tejido adiposo haya emergido como un nuevo órgano clave en la regulación de la homeostasis energética y nutricional, teniendo un papel clave en procesos como la regulación del apetito, el control de la sensibilidad a la insulina o la regulación de la temperatura corporal.

La unidad básica de los tejidos adiposos son los adipocitos, las células encargadas de almacenar el exceso de energía en forma de vesículas lipídicas llenas de triacilglicerol. La capacidad de almacenar lípidos en su interior, aunque pueda parecer una habilidad simple, es propia y específica de los adipocitos, ya que los ácidos grasos libres presentan una alta toxicidad. A diferencia de otros tipos celulares los adipocitos están preparados para contener grandes cantidades de lípidos intracelulares sin sufrir sus efectos lipotóxicos. Es cierto que se pueden encontrar pequeñas vesículas lipídicas en otros linajes celulares, como es el caso de los hepatocitos y los cardiomiocitos, sin embargo, la presencia de estas vesículas lipídicas de manera permanente se considera patológica.

Los tejidos adiposos no están formados únicamente por adipocitos, sino que están acompañados de otros tipos celulares como células endoteliales, terminaciones neuronales, células madre pluripotenciales, pre adipocitos, fibroblastos y células del sistema inmune (las cuales tienen un papel clave en los efectos perniciosos que tiene la obesidad). Todos estos distintos tipos celulares

forman un conjunto denominado fracción del estroma vascular (SVF) (Cinti, 2005).

1.1. Tipos de tejido adiposo

Podemos dividir el tejido adiposo de los mamíferos en dos grandes grupos, que se diferencian tanto en su morfología celular y tisular como en su función, la cual, de hecho, es antagónica. Estos tejidos son el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo marrón (TAM).

1.1.1. El tejido adiposo blanco

El TAB está conformado principalmente por adipocitos blancos cuya función es almacenar reservas de energía en forma de triglicéridos (TG). Guardan estos TGs en una gran vesícula lipídica que ocupa más del 90% del volumen citosólico.

Ante periodos de ayuno, exposición crónica al frío y otros momentos en los que se haría necesaria la movilización de reservas, los TG serán hidrolizados dando lugar ácidos grasos y glicerol, que serán liberados al torrente sanguíneo. Los ácidos grasos liberados serán utilizados como combustible por células de todo el cuerpo. A esta ruptura de los TG como forma de obtención de energía se la denomina lipólisis (Giralt and Villarroja, 2013).

1.1.2. El tejido adiposo marrón

El tejido adiposo marrón (TAM), conocido más vulgarmente como grasa parda, está formado principalmente por adipocitos marrones. Su función principal es antagónica a la del TAB, ya que, en vez de almacenar energía como reserva, la quema para generar calor. El TAM también almacena TGs, pero en su caso lo hace para su propio uso, siendo un órgano dedicado al mantenimiento de la temperatura corporal del organismo a través de un proceso conocido como termogénesis adaptativa o termogénesis no asociada a temblor (*non-shivering thermogenesis*).

En el caso del TAM, a diferencia del TAB, los TG se almacenan en múltiples vesículas lipídicas dispersas por el citoplasma. Por ser un tipo celular metabólicamente muy activo, el adipocito marrón se caracteriza también por la abundancia de mitocondrias en su citoplasma.

Las mitocondrias del TAM tienen una gran capacidad oxidativa y son capaces de disipar calor gracias a una proteína única y específica de este órgano: la proteína desacopladora 1 (UCP1). Esta proteína se encuentra en la membrana mitocondrial interna y es capaz de desacoplar la cadena de transporte de electrones durante la fosforilación oxidativa, disipando el gradiente de protones de manera que se genera calor en lugar de ATP.

Los depósitos de TAM se encuentran abundantemente innervados ya que, como veremos más adelante, su actividad está regulada principalmente por señales β -adrenérgicas. Además este órgano está muy irrigado por vasos sanguíneos, no sólo para poder recibir el oxígeno y los sustratos metabólicos que necesita para llevar a cabo su labor, sino porque así puede calentar la sangre y esparcir el calor que genera por todo el cuerpo (Giralt and Villarroya, 2013).

1.1.3. El tejido adiposo beige o *brite*

En el año 2012 se identificó un nuevo tipo de adipocito. Un adipocito similar al blanco pero que se comporta como uno marrón y que es capaz de generar calor: el adipocito beige o *brite*. Su morfología es similar a la de los adipocitos marrones clásicos, son también multiloculares y poseen una gran cantidad de mitocondrias, las cuales, además poseen en su membrana interna la proteína UCP1, lo que les permite generar calor (Ishibashi and Seale, 2010; Wu *et al.*, 2012).

Estos aparecen agrupados en isletas en zonas de TAB, sobre todo en los depósitos subcutáneos, cuando la exposición a bajas temperaturas se prolonga en el tiempo. Este fenómeno es conocido como *browning*, término este al que

aún no se le ha asignado una traducción oficial al castellano, pero al que podríamos referirnos como *pardeamiento* de la grasa.

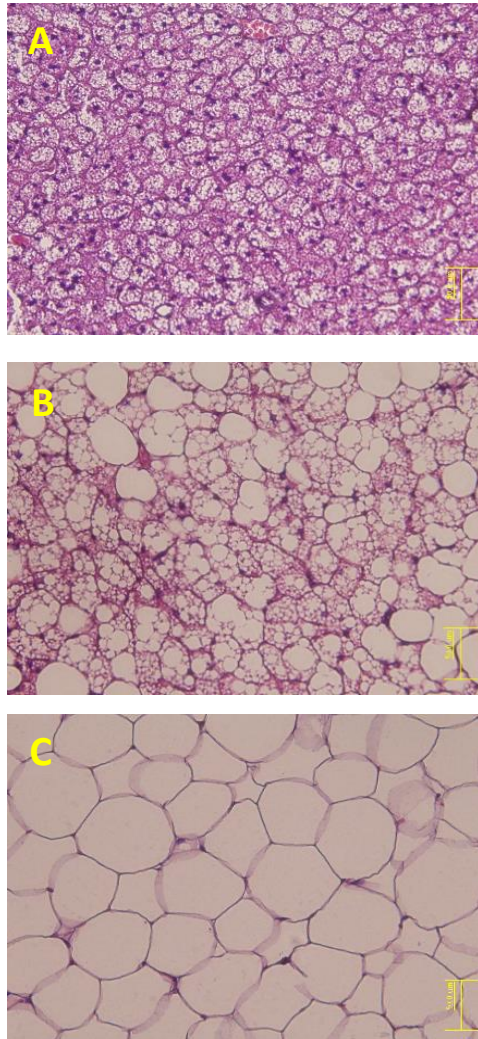


Figura 1. Cortes histológicos de TAB (A), TAM (B) y de depósitos de adipocitos beige en TAB (C) (Fuente propia).

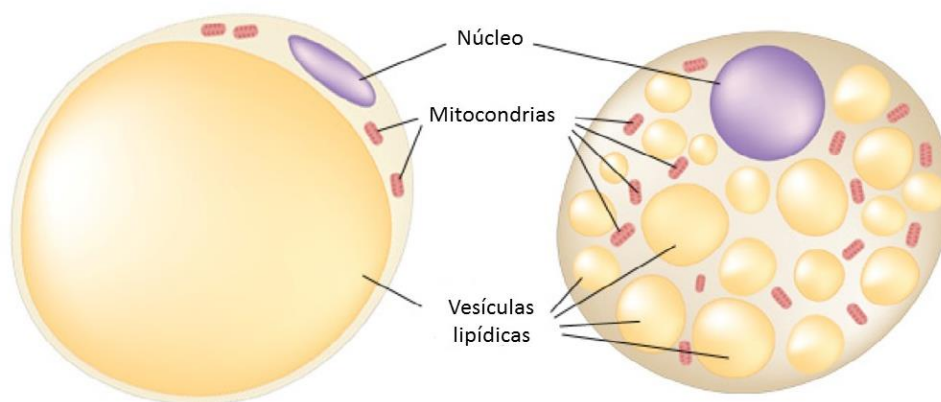


Figura 2. Representación esquemática de un adipocito blanco (izquierda) y de un adipocito marrón (derecha) en la que se señalan sus principales características morfológicas. Adaptación de (Harms and Seale, 2013).

1.2. La distribución del tejido adiposo

El tejido adiposo se encuentra distribuido en varios depósitos a lo largo del cuerpo. La distribución anatómica de los depósitos adiposos se encuentra relacionada con las funciones que llevan a cabo y con la fisiología del órgano. Esto hace que los depósitos se estudien por separado.

1.2.1. Distribución del tejido adiposo en ratón

El ratón (*Mus musculus*) ha sido el modelo utilizado durante esta tesis para los experimentos in vivo. Una de las principales diferencias entre la distribución de los tejidos adiposos en ratón y en humanos radica en que los primeros poseen el TAB subcutáneo dividido en depósitos que se acumulan en varias partes del cuerpo (Figura 3): el depósito de TAB subcutáneo anterior; el dorsal, que cubre el TAM interescapular; y el subcutáneo posterior, donde se encuentra el tejido adiposo inguinal, de gran importancia para este trabajo por su alta capacidad para hacer browning (Virtanen *et al.*, 2009).

Existen también varios tipos de depósitos de TAB viscerales principales: el mesentérico, que se encuentra rodeando los intestinos; el omental, sobre la superficie del estómago; el cardíaco, recubriendo el corazón; el retroperitoneal, en la zona dorsal; y el perigonadal, que recubre las gónadas tanto de los machos (TAB epididimal) como de las hembras (TAB periovárico). El TAB perigonadal, por su localización y por su fisiopatología, es utilizado como modelo del depósito visceral.

En el caso del TAM, los ratones poseen el depósito cervical, subescapular, mediastinal y perirrenal. Pero el más importante para este trabajo ha sido el que se sitúa entre los omóplatos del ratón, el TAM interescapular. Este depósito, con forma de mariposa, es que ha sido recogido y analizado en los experimentos in vivo, como el que ha sido utilizado para la obtención de precursores de adipocitos marrones.

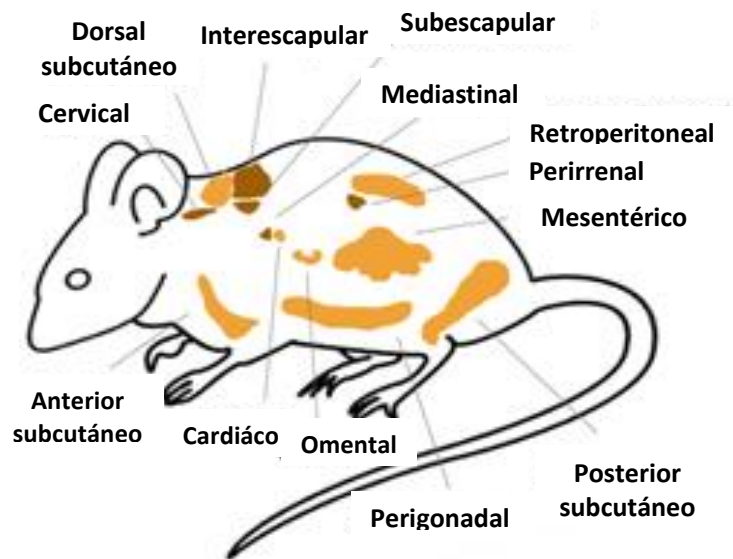


Figura 3. Distribución del tejido adiposo blanco y marrón en ratón. Adaptado de (Virtanen *et al.*, 2009)

1.2.2. Distribución del tejido adiposo en humanos

A diferencia de como sucede en ratones, en los que el TAB subcutáneo se distribuye en varios depósitos, en humanos este tejido se extiende de manera continua bajo la dermis, lo que le da una función como aislante térmico que se une a la del almacenamiento de reservas. Aunque se distribuye de una forma continua, existen regiones donde tiende a acumularse, como son la zona glúteo-femoral o la subcutánea abdominal (Figura 4 A y B). Sin embargo, el TAB visceral sí se divide en depósitos más o menos definidos, como son el mesentérico, el omental, el retroperitoneal, el pericárdico y el perirrenal. Existen también depósitos de TAB que tienen una función estructural o protectora, como por ejemplo los que protegen la palma de la mano, los globos oculares, o el talón. Estos depósitos también son susceptibles de sufrir alteraciones en patologías como las lipodistrofias.

En el caso del TAM, hasta hace poco se consideraba que este tejido sólo estaba presente durante la etapa neonatal e infantil, como una forma de proteger a los individuos en sus primeras etapas vitales de la abundante pérdida de calor que sufren los cuerpos pequeños. Se creía que este se perdía por completo al llegar

a la edad adulta, sin embargo, el uso de la tomografía de emisión de positrones, una técnica utilizada para detectar zonas que consumen grandes cantidades de glucosa y que se utiliza para detectar tumores (FDG-PET-CT-scan), ha revelado la existencia de TAM en humanos adultos (Figura 4 C) (Nedergaard, Bengtsson and Cannon, 2007)

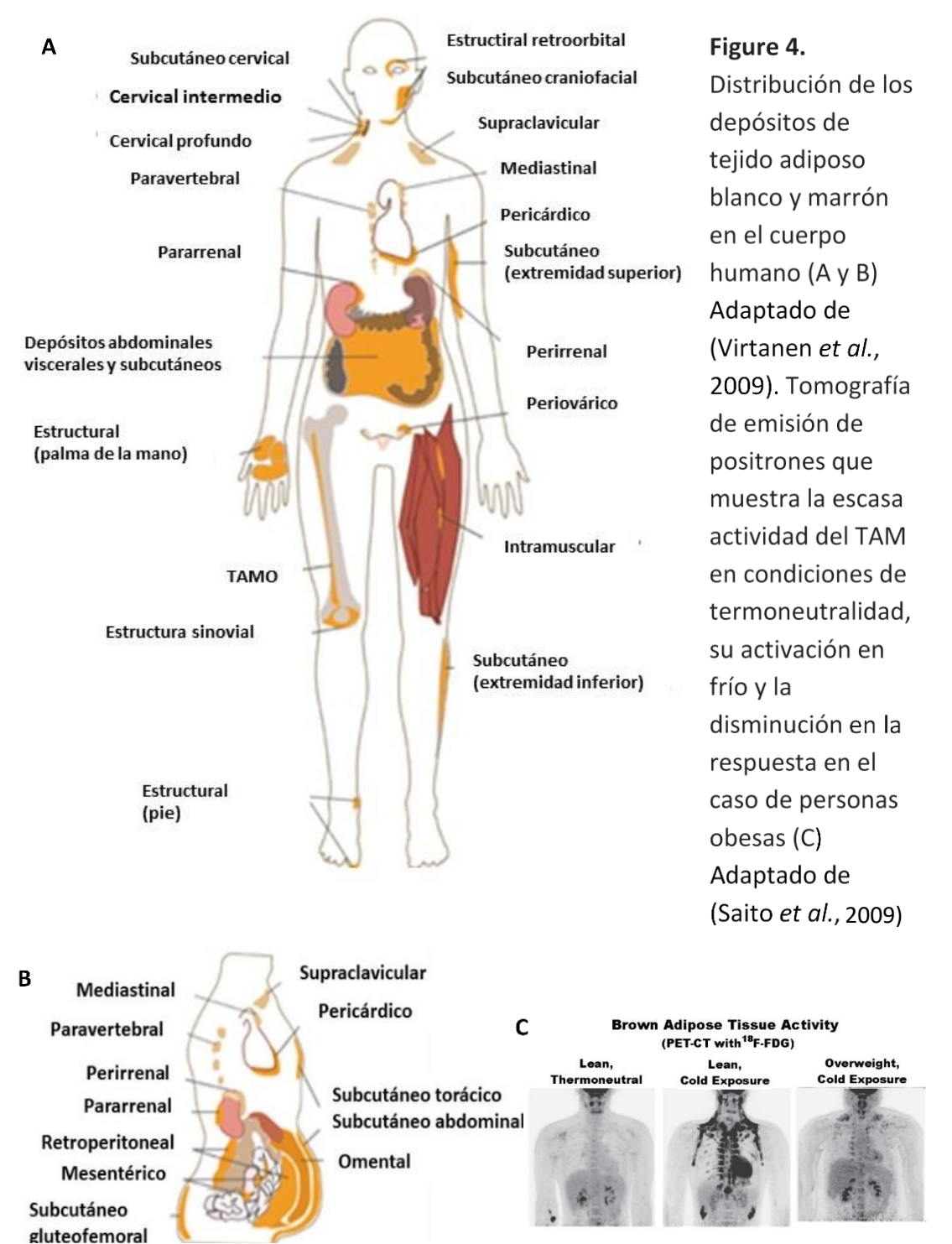


Figure 4. Distribución de los depósitos de tejido adiposo blanco y marrón en el cuerpo humano (A y B) Adaptado de (Virtanen *et al.*, 2009). Tomografía de emisión de positrones que muestra la escasa actividad del TAM en condiciones de termoneutralidad, su activación en frío y la disminución en la respuesta en el caso de personas obesas (C) Adaptado de (Saito *et al.*, 2009)

Los estudios de biopsias humanas de TAM han revelado que en estos coexisten diferentes tipos de adipocitos marrones. En humanos adultos se ha detectado la presencia tanto de adipocitos marrones clásicos como de adipocitos beige coexistiendo en los mismos depósitos durante la etapa adulta (van Marken Lichtenbelt *et al.*, 2009; Virtanen *et al.*, 2009). Los estudios posteriores han observado que existe una correlación negativa entre la presencia de este tejido activo y el índice de masa corporal (BMI) y con la edad de los pacientes (Saito *et al.*, 2009; Zingaretti *et al.*, 2009; Symonds *et al.*, 2012). Es decir, la obesidad ha sido asociada con una represión de la actividad del TAM (Figura 4 C)

2. FUNCIONES DEL TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo blanco y el marrón tienen funciones que podemos considerar antagónicas. Por un lado, el TAB almacena el superávit energético a la espera de la llegada de tiempos de escasez, mientras que el TAM quema esas reservas para generar calor. Esta relación entre ambos hace que tengan un papel crucial en el balance energético del organismo y que, por lo tanto, comprender su funcionamiento sea clave para comprender las enfermedades metabólicas.

2.1. Funciones del tejido adiposo blanco

Como ya hemos dicho, la principal función del TAB es el almacenamiento de reservas en forma de lípidos para su consumo en situaciones de déficit de energía como puedan ser el ayuno o un fuerte requerimiento de energía como las que se dan en la termogénesis adaptativa o durante el ejercicio prolongado.

Que el tejido adiposo se dedique a almacenar o a consumir energía va a depender del balance energético del individuo en ese momento. El balance energético es la diferencia entre la energía incorporada en la dieta y la energía consumida, la cual va a depender de la tasa metabólica basal (que es la energía que el organismo necesita quemar para realizar sus funciones básicas) y el gasto

energético (determinado por la actividad física o por otros procesos frente a necesidades ambientales, como la termogénesis adaptativa) (Hall *et al.*, 2012).

Si el balance es positivo, es decir, se ingiere más energía que la que se gasta, se inducirá el almacenamiento de TG en el tejido adiposo. Este proceso llevará a una expansión del tejido adiposo mediante el aumento del tamaño de los adipocitos (hipertrofia) o incrementando el número de ellos (hiperplasia). Esta expansión del adiposo tiene su máxima expresión en el desarrollo de obesidad, siendo en esta la hipertrofia la que se ha relacionado con los efectos más perniciosos de esta enfermedad (Taube *et al.*, 2012).

Si el balance energético es negativo, es decir, se consume más energía de la que se ingiere, el tejido adiposo blanco movilizará sus reservas de TG. Estos TG, mediante un proceso llamado lipólisis, serán hidrolizados para liberar sus ácidos grasos, que serán enviados mediante el flujo sanguíneo a los tejidos que los necesiten, los cuales obtendrán energía de ellos mediante la β -oxidación.

La sociedad actual sufre una creciente epidemia de obesidad y sobrepeso que, debido a las comorbilidades asociadas a esta dolencia, amenaza con colapsar los sistemas de salud. Esta tendencia creciente a un balance energético positivo se debe al desarrollo de lo que algunos han denominado como “sociedades obesogénicas”. Sociedades en las que se tiende al uso del transporte motorizado, en las que el urbanismo y/o la inseguridad ponen barreras a la actividad física, sociedades en las que abundan alimentos hipercalóricos que con una alta capacidad para activar las vías dopaminérgicas y generar adicción (Berthoud, 2012; Mustajoki, 2015). Algunos estudios también han relacionado esta epidemia de obesidad con el abandono del trabajo en el exterior, lo que conlleva que pasemos grandes cantidades de tiempo en ambientes termoneutrales, lo que lleva a la degeneración del TAM o *whitening* (Lichtenbelt *et al.*, 2014).

2.1.1. Síntesis de triglicéridos

Durante la ingesta de alimentos los lípidos son absorbidos por el intestino y entran al torrente sanguíneo en forma de quilomicrones. Por su parte, el hígado, pone en marcha la lipogénesis de *ново*, que transforma los excedentes de carbohidratos en TG que son liberados al torrente sanguíneo en forma de VLDL (lipoproteína de muy baja densidad). Los quilomicrones y las VLDL distribuyen los lípidos por los tejidos del organismo. Antes de pasar a los tejidos, las células endoteliales transformarán estos lípidos en ácidos grasos libres no esterificados (NEFA) mediante la lipoproteína lipasa (LPL). Una vez dentro de las células, los NEFA serán esterificados a acetil-CoA y empleados como sustrato energético mediante la β -oxidación.

Cuando estos ácidos grasos no esterificados llegan a los tejidos adiposos y la situación energética es de superávit, estos serán reesterificados para formar TG, que serán incorporados a las vesículas lipídicas. Estos TG se van a sintetizar en el retículo endoplasmático. Irán formando agregados dentro de este que van creciendo hasta formar vesículas que se separan de este y quedan rodeadas por una membrana de fosfolípidos, colesterol y de una serie de proteínas que son clave para la estructura de la vesícula y que controlan los procesos de regulación y degradación de esta. Algunas de estas proteínas son la caveolina 1, la adipofilina, las perilipinas y las proteínas de la familia de los factores inductores de muerte celular similar al factor de fragmentación del ADN (CIDE) (Brasaemle, 2007). En el caso de los adipocitos blancos estas vesículas se fusionan en una gran vesícula lipídica que abarca casi todo el citoplasma, hasta el punto de desplazar al núcleo a la periferia.

El proceso de lipogénesis está muy regulado mediante hormonas y factores de crecimiento, garantizando así respetar las necesidades del organismo de acuerdo con el balance energético del momento. Por ejemplo, el aumento en la insulina que se produce tras la ingesta de alimentos induce la lipogénesis y promueve la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana celular de los adipocitos para favorecer la entrada glucosa en estos. Por el

contrario, cuando el organismo se encuentra en una situación de ayuno, el glucagón inhibe la lipogénesis y activa la lipólisis (Kersten, 2001).

2.1.2. Lipólisis

En el caso de que el balance energético del organismo sea negativo o de que se necesite un aporte extra de energía, se activará la lipólisis en el tejido adiposo blanco. Este proceso separa los componentes de los triacilglicerolos, liberando los tres ácidos grasos no esterificados y la molécula de glicerol que formaban el triacilglicerol. Tanto el glicerol como los ácidos grasos serán liberados al torrente sanguíneo, siendo estos últimos los que servirán a los tejidos para obtener energía al ser utilizados como sustrato para la β -oxidación mitocondrial. (Figura 5).

El ayuno produce una caída en el ratio insulina-glucagón que actúa como señal de activación de la lipólisis. Esta ruta también puede ser activada por un incremento en los niveles de catecolaminas, que van a indicar que el cuerpo necesita un aporte extra de energía para enfrentarse a un estresor como puede ser el frío, un aumento en la actividad física o una respuesta de huida o lucha (Frühbeck *et al.*, 2014). La noradrenalina (NA) induce la lipólisis en los adipocitos marrones y beige para obtener energía para la generación de calor.

Independientemente de la vía utilizada, la señal activará la proteína quinasa A (PKA) que fosforilará a la lipasa sensible a hormonas (HSL) activándola, y a la perilipina A, una proteína que recubre la membrana de las vesículas lipídicas protegiendo a los lípidos de la entrada de lipasas. Precisamente la fosforilación de la perilipina alterará la estructura de dicha membrana y permitirá la entrada de la HSL (ya activa) y de otras lipasas (Sztalryd *et al.*, 2003).

A la HSL se unirá la proteína de unión a ácidos 4 (FABP4), que ayudará a la lipasa a entrar dentro de la vesícula. La FABP4 también actuará de forma independiente a HSL, contribuyendo al transporte de los ácidos grasos hacia la membrana plasmática para que sean liberados fuera de la célula (Frühbeck *et al.*, 2014).

Una vez que el interior de la vesícula lipídica es accesible la HSL no es la única lipasa que degrada los TG. La lipasa de triglicéridos adipocitaria (ATGL) hidroliza los TG en un diacilglicerol y un ácido graso no esterificado (NEFA), mientras que la monoglicérido lipasa (MGL) hidroliza monoacilgliceroles en glicerol y un ácido graso.

En el caso de los adipocitos blancos, los ácidos grasos liberados irán a otros tejidos transportados por el torrente sanguíneo, mientras que en el caso de los marrones ellos mismos pueden usarlos como fuente de energía. Tanto si van a otros tejidos como si sirven de sustrato al propio adipocito, estos ácidos grasos proporcionarán energía como sustratos de la β -oxidación, un proceso que tiene lugar en el interior de las mitocondrias, dentro de las cuales acceden gracias a una lanzadera de carnitina y a la acción de la carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1) (Frühbeck *et al.*, 2014).

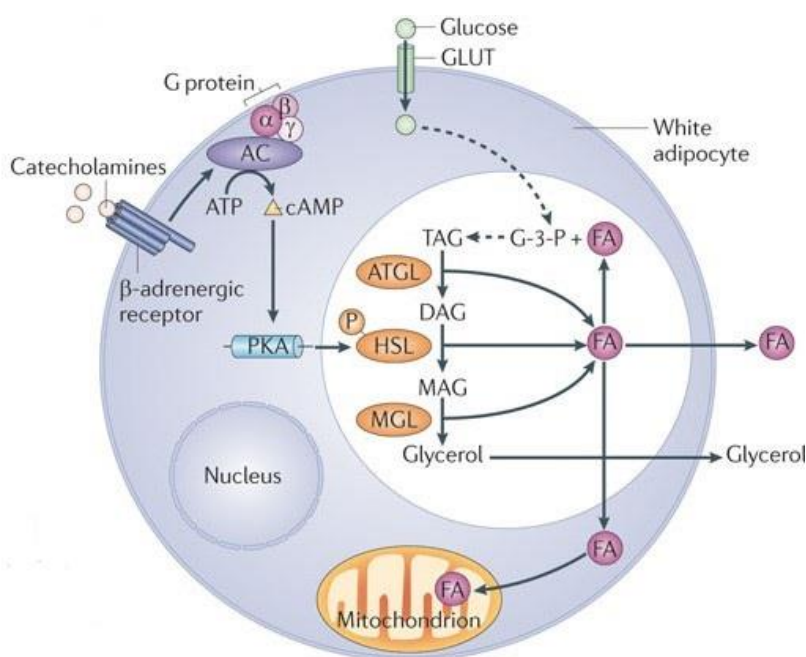


Figura 5. Esquema del proceso de la lipólisis en un adipocito (Altarejos and Montminy, 2011)

2.1.3. El tejido adiposo blanco como órgano secretor

Como ya dijimos, las funciones del TAB no se limitan al almacenamiento de energía. Es también un órgano endocrino que secreta hormonas y citoquinas de gran importancia en la regulación de múltiples funciones sistémicas. Estos factores secretados se denominan adipocinas y pueden actuar a nivel autocrino, paracrino y endocrino.

2.1.3.1. Leptina

La leptina es una adipocina producida principalmente por los adipocitos blancos, especialmente por los que se encuentran en depósitos subcutáneos. Su función es la de actuar como lo que se ha venido a denominar clásicamente el lipostato, actuando como un mensajero que envía información sobre el estado nutricional del tejido adiposo. Esta adipocina, que actúa como una hormona, actúa sobre el hipotálamo inhibiendo el apetito. Puesto que a mayor masa de tejido adiposo tenga un organismo mayores serán sus niveles de circulantes de leptina, más inhibida estará la ingesta de alimentos (Friedman and Halaas, 1998).

Pero sus efectos reductores de la masa adiposa no sólo se limitan su actuación sobre el apetito. La leptina induce el envío de señales a los tejidos periféricos capaces de aumentar la oxidación de ácidos grasos, reducir la glucosa plasmática, e inducir la termogénesis (Friedman and Halaas, 1998).

Cuando la situación es la inversa y hay una situación de ayuno, los niveles de leptina, al igual que los de insulina, disminuyen. La caída en los niveles de estas dos hormonas estimula el apetito e inhibe la actividad simpática que activa la lipólisis y termogénesis (Ahima *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 2003).

Las personas obesas presentan niveles muy altos de leptina circulantes, indicando un estado de resistencia al efecto de esta hormona. Esta resistencia se da tanto a nivel central, donde el hipotálamo deja de ejercer su papel inhibidor

del apetito, como a nivel periférico, sobre todo a nivel del músculo esquelético (Fried and Ricci, 2000; Steinberg *et al.*, 2002; Steinberg, 2003).

2.1.3.2. Adiponectina

La adiponectina (también denominada AdipoQ) es una citoquina producida únicamente por el tejido adiposo y que se encuentra en el plasma en grandes concentraciones. Esta adipoquina actúa aumentando la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos. Realiza esta acción desencadenando una cascada de señalización que activa la quinasa activada por AMP (AMPK). La AMPK actúa como un sensor nutricional y cuando está activada es capaz de promover la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético, de inhibir la gluconeogénesis en el hígado y de inhibir la lipólisis en los adipocitos para favorecer la captación de glucosa (Yamauchi *et al.*, 2002).

Las moléculas proinflamatorias inhiben la producción y liberación de adiponectina por parte de los adipocitos, siendo probablemente un efecto derivado de la inhibición de la expresión de *PPAR γ* , ya que este tiene al gen codifica la adiponectina como diana transcripcional (Ouchi *et al.*, 2011).

Esto concuerda con el hecho de que en los individuos obesos y con diabetes tipo 2, en los cuales el tejido adiposo sufre una inflamación crónica, los niveles de adiponectina se encuentran disminuidos y se correlacionan negativamente con la adiposidad (Ryo *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2009).

2.1.3.3. Resistina

La resistina es una adipoquina producida por el tejido adiposo blanco y que se relaciona con la captación de glucosa y con el desarrollo de procesos inflamatorios. La resistina disminuye la sensibilidad a la insulina. En condiciones fisiológicas esta función contribuye a la regulación del metabolismo de la glucosa, pero en situaciones de obesidad se relaciona con el desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes tipo 2, aunque su función en humanos no está clara (Banerjee, 2004).

En los ratones es producida por los adipocitos blancos, mientras que en humanos la producen los macrófagos y los monocitos que se encuentran en el tejido adiposo (Steppan *et al.*, 2001; Patel *et al.*, 2003).

Aunque estas tres proteínas son las principales adipoquinas secretadas por el tejido adiposo blanco, este secreta una gran variedad de moléculas reguladoras como son la adiposina, la apelina, la omentina, la proteína de unión a retinol 4 (RBP4), la vaspina o la visfatina. Además, los ácidos grasos liberados durante la lipólisis poseen una función señalizadora, siendo capaces de activar vías de señalización celular en diferentes tipos de tejidos a través de receptores acoplados a proteínas G. De hecho, el continuo estado de liberación de NEFAs que se da en la obesidad y la señalización de estos sobre células del sistema inmune parecen tener un rol en el desarrollo de la diabetes tipo 2 (Harwood, 2012).

2.2. Funciones del tejido adiposo marrón

El tejido adiposo marrón, o TAM, fué descrito por primera vez en pequeños mamíferos hibernantes, por eso recibió el nombre de glándula de hibernación (Rasmussen, 1923). Cuanto más pequeño es un animal, mayor es la relación superficie/volumen de su cuerpo, lo que lleva a una mayor pérdida de calor. Esto hace necesarios mecanismos de defensa ante las bajas temperaturas y que, además, no supongan un gasto energético tan poco sostenible a largo plazo como la contracción muscular. En este contexto, el TAM, capaz de generar calor en un proceso denominado termogénesis adaptativa, supone una gran ventaja evolutiva que se extiende por casi toda la rama evolutiva de los mamíferos placentarios.

Inicialmente la presencia de TAM en humanos se describió únicamente durante la infancia. Los recién nacidos tienen grandes cantidades de este tejido debido a que, como ya hemos dicho, su pequeño tamaño les hace perder calor con facilidad. En los humanos adultos el TAM fue descubierto hace muy poco tiempo, sin embargo, en pocos años se ha puesto en el punto de mira de la búsqueda de

dianas terapéuticas para el tratamiento de la obesidad y la diabetes tipo II debido a su elevada capacidad para oxidar sustratos energéticos.

El adiposo marrón es un tejido muy innervado debido a que la activación de la termogénesis está controlada por las aferencias nerviosas de las neuronas noradrenérgicas (Morrison, Madden and Tupone, 2014). También se encuentra altamente irrigado ya que extrae oxígeno y sustratos metabólicos del torrente sanguíneo, y además, transmite el calor que genera por todo el cuerpo a través de la sangre (Cannon and Nedergaard, 2004). En el caso del tejido adiposo blanco, cuando una exposición crónica al frío conduce a un proceso de *browning*, se produce un aumento de la irrigación y la innervación de los depósitos de TAB en las inmediaciones de las isletas de adipocitos beige.

2.2.1. Fisiología de la termogénesis adaptativa

2.2.1.1. Respuestas aguda y crónica al frío

Ante una bajada de la temperatura las terminaciones nerviosas de la piel mandarían la señal al sistema nervioso central, concretamente al hipotálamo, que actúa como termostato del organismo de los mamíferos y cuya respuesta dependerá de la duración de la exposición al frío (Morrison, Madden and Tupone, 2014). Las respuestas agudas están mediadas por un aumento de la actividad simpática que produce una rápida vasoconstricción periférica, la activación de la generación de calor por contracción de fibras musculares (tiritos), la activación del TAM y un aumento del flujo sanguíneo hacia este tejido (Cannon and Nedergaard, 2004; Haman, 2006).

La capacidad del TAM para generar calor ante un estímulo agudo dependerá de los niveles de la proteína UCP1 de este, lo que vendrá determinado por la exposición al frío que haya tenido el organismo previamente. En condiciones de termoneutralidad, cuando el metabolismo basal es suficiente para el mantenimiento de la temperatura corporal, el TAM se inactiva: sus vesículas lipídicas se fusionan, pierde proteínas mitocondriales y termina adquiriendo un aspecto y unas características similares a las del tejido adiposo blanco en un

proceso conocido como *whitening* (Feldmann *et al.*, 2009). Sin embargo, si el organismo ya ha sufrido un proceso previo de adaptación al frío, los niveles de UCP1 serán más altos y permitirán una activación del TAM más rápida (Cannon and Nedergaard, 2011).

Este proceso de adaptación al frío crónico se caracteriza por el reclutamiento de nuevos adipocitos marrones (hiperplasia) y por activación de la síntesis de proteínas del programa termogénico (como UCP1, PGC1 α , BMP8b o las proteínas COX) y de enzimas de la lipólisis y de la β -oxidación de ácidos grasos. En el caso del TAB, ante la exposición crónica al frío veremos cómo se inducen procesos de *browning*.

2.2.1.2. Activación de la termogénesis por estímulos β -adrenérgicos

Cuando el hipotálamo recibe la señal de frío produce un aumento en la actividad de las terminaciones nerviosas simpáticas del TAM, haciendo que estas liberen noradrenalina (NA). La noradrenalina, también conocida como norepinefrina (NE) es la principal señal activadora del TAM. La noradrenalina ejerce su acción a través de los receptores β -adrenérgicos que abundan a lo largo de la membrana plasmática de los adipocitos marrones, concretamente a través del receptor β_3 , que es el más abundante. (Figura 6).

Cuando la NE activa los receptores β_3 -adrenérgicos, estos promoverán la activación de la adenilato ciclasa, que aumentará los niveles de AMPc, que inducirán la activación de la proteína kinasa A (PKA) (Cannon and Nedergaard, 2004). Esta proteína no sólo es capaz de realizar la función de la que hablamos anteriormente de permitir la entrada de lipasas en las vesículas lipídicas para que se lleve a cabo la lipólisis, además la PKA activa el programa termogénico de manera directa través del factor de transcripción de respuesta a AMPc (CREB) y de ATF2, que activan la transcripción de genes que contienen los elementos de respuesta CRE, como UCP1 o PGC1 α . Pero la PKA también puede activar este programa activando la proteína p38MAPK, que fosforila PGC1 α permitiendo que este pueda ejercer como coactivador transcripcional del gen que codifica la proteína UCP1 (Cao *et al.*, 2001; Thonberg *et al.*, 2002).

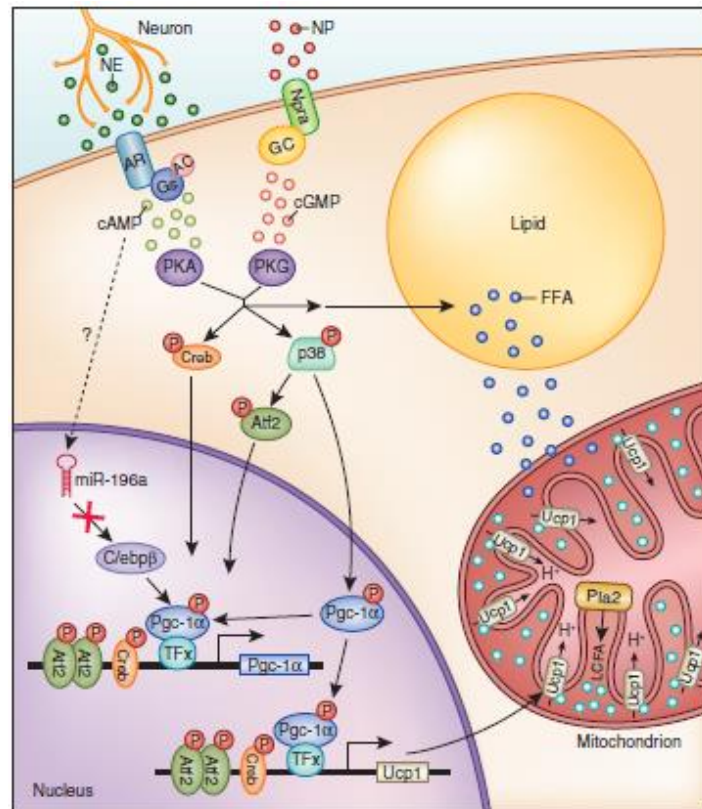


Figura 6. Esquema de la inducción de la termogénesis adaptativa por parte de un estímulo beta-adrenérgico (Harms and Seale, 2013)

2.2.1.3. El mecanismo de producción de calor en los adipocitos

Los adipocitos marrones y beige son capaces de generar calor gracias a la presencia en sus mitocondrias de la proteína UCP1 (*uncoupling protein 1*), capaz de desacoplar la cadena de transporte de electrones de la producción de ATP por parte de la ATP sintasa (fosforilación oxidativa).

La cadena transportadora de electrones, que tiene lugar en la membrana mitocondrial interna, produce una diferencia de cargas entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana que genera un gradiente de protones que funciona a modo de motor de la ATP sintasa, un complejo que genera el ATP que almacena la energía que va a utilizar la célula.

UCP1 se sitúa en la membrana mitocondrial interna, donde cataliza un flujo de protones desde el espacio intermembrana hasta la matriz mitocondrial. Ésta

pérdida de protones disipa la energía generada por el gradiente electroquímico en forma de calor.

Normalmente la acumulación de ATP termina inhibiendo el catabolismo mitocondrial. Como durante la termogénesis se genera menos ATP y a menor ritmo, este no parará el proceso. Es por eso que UCP1 acelera la oxidación de sustratos energéticos y convierte al adiposo marrón en un tejido que consume mucha energía (Golozoubova, 2001; Krauss, Zhang and Lowell, 2005).

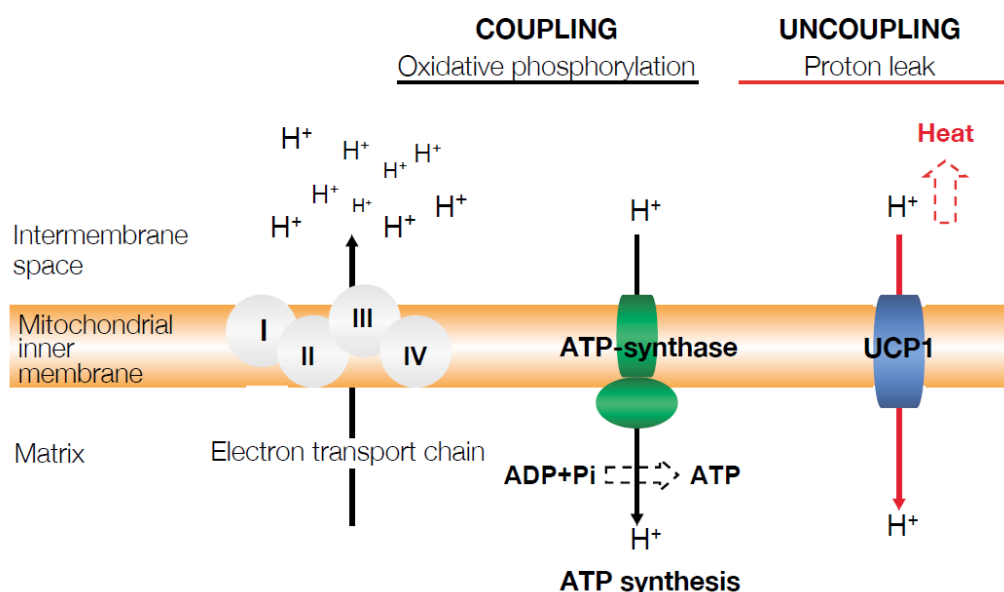


Figura 7. Esquema del desacoplamiento que UCP1 hace de la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa.

3. EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO

El TAM y el TAB se desarrollan en diferentes momentos de la ontogenia de los individuos. En la mayor parte de los mamíferos el adiposo marrón se desarrolla antes que el blanco. Es el caso de los ratones el TAM se desarrolla durante el periodo fetal y se activa poco después del nacimiento (Cannon and Nedergaard, 2004; Symonds, Pope and Budge, 2015) gracias al estímulo que producen los ácidos grasos libres de la leche materna y al estímulo termogénico asociado al paso del ambiente intrauterino al extrauterino (Hondares *et al.*, 2010). Así los

recién nacidos se preparan para combatir el estrés térmico que supone abandonar el cuerpo de su madre, pero sin comenzar a quemar energía para ello hasta que el animal haya comenzado a recibir el aporte calórico de la leche. Los ratones comenzarán a desarrollar el TAB a los pocos días de vida, sin embargo en los humanos el TAB aparece durante la mitad de la gestación.

Tanto el tejido adiposo blanco como el marrón tienen su origen en el tejido embrionario mesodérmico. Los adipocitos se originan a partir de las células madre mesenquimales (MSCs) durante el proceso llamado adipogénesis, el cual se divide en dos grandes fases. Durante la primera fase, o de determinación, se decidirá el linaje de estas células mesenquimales y estas se convertirán en preadipocitos, los cuales adquieren la maquinaria proteica necesaria para sintetizar lípidos y formar las vesículas lipídicas durante una fase denominada diferenciación terminal (Cristancho and Lazar, 2011).

3.1. Fase de determinación del linaje

Los adipocitos blancos y marrones se originan a partir de diferentes células precursoras. Clásicamente se ha considerado que las células precursoras de adipocitos marrones eran aquellas que expresaban el factor miogénico 5 (Myf5+) y la proteína Paired-box 7 (Pax7+), las cuales formaban parte del mismo linaje que las células musculares. Mientras que las células precursoras de adipocitos blancos y beige derivarían de precursores Myf5-. Sin embargo, recientemente se ha cambiado este paradigma sobre la adipogénesis al haberse observado la presencia de adipocitos blancos provenientes de precursores Myf5+ y de adipocitos marrones provenientes de precursores Myf5- distribuidos en los diferentes depósitos adiposos (Sanchez-Gurmaches *et al.*, 2012; Sanchez-Gurmaches and Guertin, 2014).

Las últimas investigaciones indican que los adipocitos de la zona dorsal-anterior tienden a provenir de precursores Myf5+, mientras que los de la zona ventral-posterior lo hacen de precursores Myf5-. Estos estudios apuntan a la posición anatómica de los precursores como el factor más importante en la determinación

de su linaje (Sanchez-Gurmaches *et al.*, 2012; Sanchez-Gurmaches and Guertin, 2014).

Los procesos que tienen lugar durante la diferenciación de los adipocitos se han estudiado principalmente a partir de modelos *in vitro*. En estos se ha podido observar la crucial importancia sobre la determinación del linaje que tienen las diferentes combinaciones de una serie de proteínas de diferentes familias. Estas proteínas secretables proadipogénicas son principalmente las de la familia de las WNT y las de la superfamilia de factores de transformación tumorales β (TGF β).

Según se produzcan unas u otras combinaciones de factores WNT y TGF β , se puede favorecer que los precursores se diferencien en adipocitos blancos, en adipocitos marrones o que viren su diferenciación hacia otros linajes, como células óseas o musculares (Takada, Kouzmenko and Kato, 2009; Zamani and Brown, 2011). De hecho, dentro de las mismas familias de factores proadipogénicos sus miembros pueden derivar la adipogénesis hacia uno u otro sentido. Por ejemplo, dentro de la superfamilia de los TGF β se encuentran las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs). Mientras que algunas de ellas, como BMP2 y BMP4, promueven la adipogénesis hacia adipocitos blancos (Sottile and Seuwen, 2000; Skillington, Choy and Derynck, 2002), otras, como BMP7 y BMP9 promueven la adipogénesis hacia adipocitos marrones (Tseng *et al.*, 2008; Kuo *et al.*, 2014). Incluso algunos miembros de las familias WNT y TGF β pueden actuar como inhibidores de la adipogénesis.

Esta compleja fase de determinación del linaje no sólo está regulada por las diferentes combinaciones de factores secretables, sino también por estímulos físicos y mecánicos. Hay que tener en cuenta que durante la adipogénesis las MSCs han de pasar de una morfología alargada a la forma esférica característica de los adipocitos. Esto hace que la rigidez de la matriz extracelular, o un exceso de esta asociado a un proceso de fibrosis, pueden suponer un obstáculo para la adipogénesis. También tiene una gran importancia el contacto célula-célula, cuya ausencia o presencia puede determinar que la diferenciación se decante por diferentes caminos (Lefterova and Lazar, 2009; Cristancho and Lazar, 2011).

Cuando los precursores mesenquimales ya se han diferenciado hasta el estado de preadipocitos, el linaje celular ya ha quedado determinado. A partir de este punto tienen lugar una serie de eventos transcripcionales hasta llegar al adipocito maduro. Estos eventos son diferentes en adipocitos blancos y en adipocitos marrones.

3.2. Diferenciación de los adipocitos blancos

Durante la diferenciación terminal los preadipocitos adquieren la maquinaria celular que les permitirá llevar a cabo las funciones de almacenamiento y movilización de triacilgliceroles y su función secretora. Esto lo consiguen principalmente gracias a la expresión de varios factores de transcripción claves: por un lado el receptor nuclear *PPAR* γ y por el otro los miembros de la familia de proteínas de unión a la secuencia CCAAT: *C/EBP* α y β y δ .

Durante una primera fase los factores adipogénicos presentes en el entorno celular van a inducir la expresión de *C/EBP* β . Lo harán aumentando los niveles de AMPc, lo que activará la PKA y esta a su vez al factor de transcripción CREB, que se unirá al elemento de respuesta a AMPc del promotor de *C/EBP* β . Estos factores adipogénicos también inducirán la expresión de *C/EBP* δ (Tanaka *et al.*, 1997). Estos dos *C/EBPs* promoverán la expresión de otros factores de transcripción como el receptor de glucocorticoides (GR), el receptor de retinoides X (RXR) y los genes maestros de la adipogénesis: *PPAR* γ y *C/EBP* α que marcarán el desarrollo de la segunda fase de la diferenciación terminal (Tang, Zhang and Daniel Lane, 2004).

Durante la segunda fase *PPAR* γ forma un heterodímero con el receptor de retinoide RXR y juntos se unen al ADN, iniciando la transcripción de los genes diana. Tanto el complejo *PPAR* γ -RXR como *C/EBP* α van a promover la expresión de los genes de la mayoría de proteínas características de los adipocitos blancos. Entre estas se van a encontrar proteínas clave para el almacenamiento de triacilgliceroles, como la enzima de síntesis de ácidos grasos (FAS), el transportador de glucosa 4 (GLUT4) o la proteína de unión a ácidos

grasos 4 (FABP4); así como los enzimas necesarios para llevar a cabo la lipogénesis y la lipólisis, como la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la lipasa sensible a hormonas (HSL) y algunas adipoquinas como la adiponectina (Wu *et al.*, 1999; Tontonoz and Spiegelman, 2008).

3.3. Diferenciación de los adipocitos marrones

La noradrenalina liberada por las aferencias nerviosas del TAM es el principal inductor de la diferenciación y la proliferación del adiposo marrón ante el frío. Tanto en precursores mesenquimales como en preadipocitos, la NE actúa a través de los receptores adrenérgicos β_1 , induciendo la proliferación y la diferenciación de precursores y siendo responsable del aumento de la masa de TAM que se da ante exposiciones prolongadas al frío.

En el caso de los adipocitos marrones ya diferenciados, la NA aumenta los niveles de AMPc, lo que, al igual que hemos visto en el caso de la diferenciación de adipocitos blancos, promueve la expresión del factor de transcripción C/EBP β a través de CREB (Cannon and Nedergaard, 2004).

La cascada transcripcional de la diferenciación de adipocitos marrones comparte gran parte de los pasos con la de los blancos, como es el caso de la regulación a través de los factores de transcripción de la familia de los C/EBPs y PPAR γ . Sin embargo, en el caso de la diferenciación de los marrones, C/EBP α se expresa antes de que C/EBP β , siendo indispensable para la biogénesis mitocondrial y para que el adipocito desarrolle la capacidad termogénica (Carmen Carmona *et al.*, 2002).

Durante la diferenciación de los adipocitos marrones deben ponerse en marcha una serie de fenómenos transcripcionales que permiten la adquisición de la capacidad termogénica de estos. Para ello serán claves el coactivador de PPAR γ 1 α (PGC1 α) y el factor con dominios PR 16 (PRDM16).

PRDM16 interacciona con C/EBP β , induciendo la expresión de *PPAR γ* y *PGC1 α* y desencadenando el programa transcripcional característico de los adipocitos marrones (Kajimura *et al.*, 2009). Además, en un paso posterior de la diferenciación, interactúa con el complejo PPAR γ -RXR y con PPAR α . El receptor nuclear PPAR α es de gran importancia para la adquisición de las capacidades termogénicas del adipocito marrón, ya que induce la expresión de *PGC1 α* y de *UCP1* en los adipocitos ya diferenciados (Barbera *et al.*, 2001; Villarroya, Iglesias and Giralt, 2007).

Ante situaciones de exposición al frío se induce la expresión de *PGC1 α* en los adipocitos maduros por la vía de la p38MAPK y de ATF2 (Cao *et al.*, 2001, 2004). Tanto en el caso de los adipocitos marrones como en el de los beige, *PGC1 α* va a activar la expresión de genes termogénicos como *UCP1*, *DIO2* y de genes que codifican para elementos de la cadena de transporte de electrones y de la β -oxidación mitocondrial (Puigserver *et al.*, 1998; Tiraby *et al.*, 2003; Giralt *et al.*, 2011).

3.4. Diferenciación de los adipocitos beige

Cuando se produce una exposición crónica al frío, o se mimetiza esta condición mediante el uso de agonistas β -adrenérgicos, comienzan a aparecer en el tejido adiposo blanco células con características mixtas entre los adipocitos blancos y los marrones. En la actualidad existe una gran controversia sobre el origen de estos adipocitos, existiendo dos grandes teorías sobre su origen.

Una de las teorías propone que estas células provienen de adipocitos blancos que, ante un estímulo noradrenérgico, son capaces de sufrir un proceso de transdiferenciación (Barbatelli *et al.*, 1993, 2010). La otra teoría, sin embargo, niega la transdiferenciación y propone la presencia de precursores específicos de adipocitos beige (principalmente Myf5-) en el TAB. El estímulo noradrenérgico producido por el frío serviría como señal para iniciar la diferenciación de estos precursores hacia adipocitos beige (Lee *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).

Existen estudios que aportan pruebas sobre la presencia de precursores específicos de beige, así como estudios que aportan evidencias de procesos de transdiferenciación. La existencia de estudios que apoyan ambas teorías ha llevado a gran parte de la comunidad científica a considerar que ambas teorías no sólo no son excluyentes, sino que probablemente sean complementarias. Considerándose como una posibilidad muy plausible, y ya apoyada por algunos estudios, que existan fenómenos de transdiferenciación de adipocitos blancos en beige, pero que este proceso sólo pueda darse en adipocitos blancos provenientes de unos precursores especiales.

Un modelo muy interesante y representado en la (Figura 8), el que sugiere que en el TAB habitaría una población de células precursoras capaces de diferenciarse tanto en adipocitos blancos como en adipocitos beige. La dirección dependería del ambiente: en una situación de frío (o de una estimulación farmacológica de las vías β -adrenérgicas) estas células adquirirían un fenotipo beige y serían capaces de generar calor. Sin embargo, en una situación de excesiva ingesta de grasas o de termoneutralidad, estos precursores se diferenciarían en adipocitos blancos y almacenarían triacilgliceroles.

Según este modelo, la plasticidad de este sistema para cambiar de una situación de frío a una de acumulación de reservas y viceversa iría más allá, ya que las células provenientes de estos precursores serían capaces de transdiferenciarse de blanco a beige y de beige a blanco según las necesidades del momento (Bartelt and Heeren, 2014)

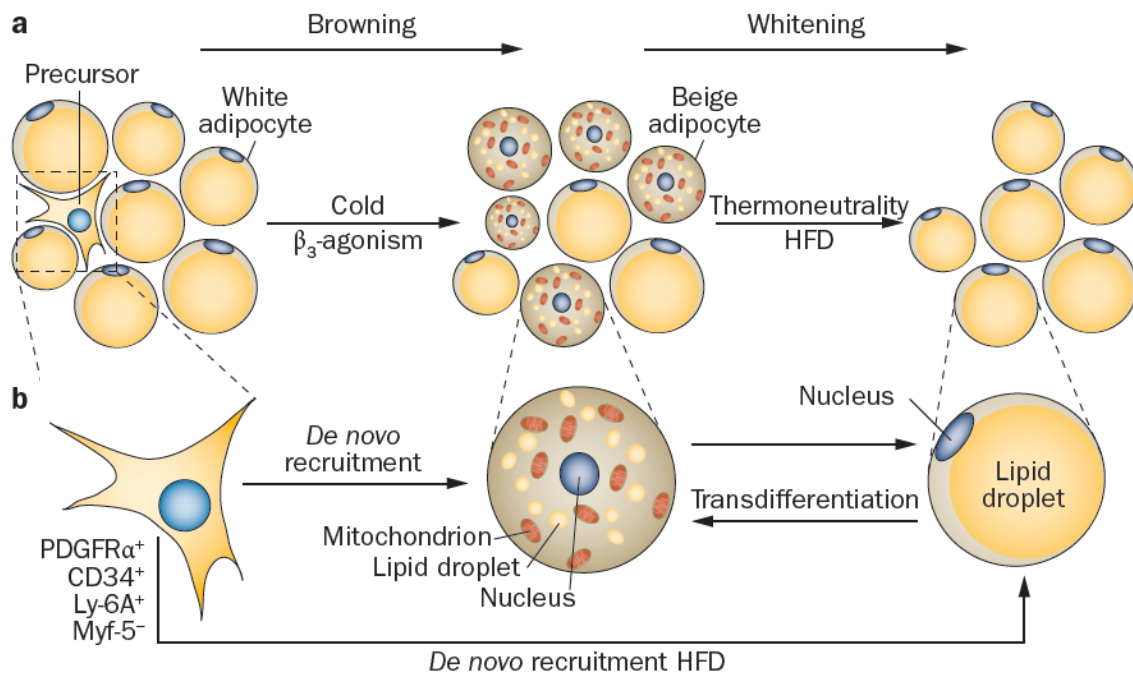


Figura 8. Esquema de la determinación y diferenciación de los adipocitos beige propuesto por Bartelt y Heeren (Bartelt and Heeren, 2014).

BLOQUE II - FIBROBLAST GROWTH FACTOR-21

1. LA FAMILIA DE LOS FGFs

Los *fibroblast growth factors* (FGFs) son una familia de factores de crecimiento que se encuentran presentes en casi todos los grupos de metazoos. En vertebrados se han descrito 22 miembros de esta familia, los cuales comparten entre un 13 y un 71% de su secuencia de aminoácidos y se encuentran en un rango de tamaños que varía de los 17 a los 34 kDa.

Los FGFs tienen varias propiedades en común que los caracterizan como familia. En primer lugar, los FGFs poseen un dominio central conservado de entre 120 y 130 aminoácidos. Entre los vertebrados, concretamente, los FGFs están muy conservados, tanto en la estructura y organización de sus genes como en la similitud entre sus isoformas proteicas.

Otra característica de esta familia es la alta afinidad de sus miembros por el glicosaminoglicado heparán-sulfato (HSGAG), molécula que es necesaria para que los receptores de los FGFs puedan ser activados.

La transducción de la señal se da a través de receptores tirosina quinasa de alta afinidad situados en la membrana celular y conocidos como FGFRs (*Fibroblast growth factor receptors*) y con la participación, en el caso de los FGFs tradicionales, del heparán-sulfato como cofactor. Sin embargo, existe una subfamilia de FGFs que actúan de modo endocrino, requiriendo estas de la presencia de una proteína llamada klotho y que actuará como correceptor (Kurosu *et al.*, 2007).

Durante el desarrollo embrionario los FGFs tienen un papel muy importante en la proliferación, la migración y la diferenciación celular. Mientras que durante la edad adulta los FGFs tienen un rol homeostático, participando en la reparación tisular y en la respuesta al daño celular. De hecho, la expresión inadecuada de

algunos miembros de esta familia se ha relacionado con la patogénesis del cáncer (Ornitz and Itoh, 2001).

Desde el punto de vista filogenético, en el caso de los vertebrados, esta familia ha sido dividida en 7 subfamilias que suman 22 miembros que van desde FGF1 a FGF23. (Itoh and Ornitz, 2004, 2011). (Figura 9).

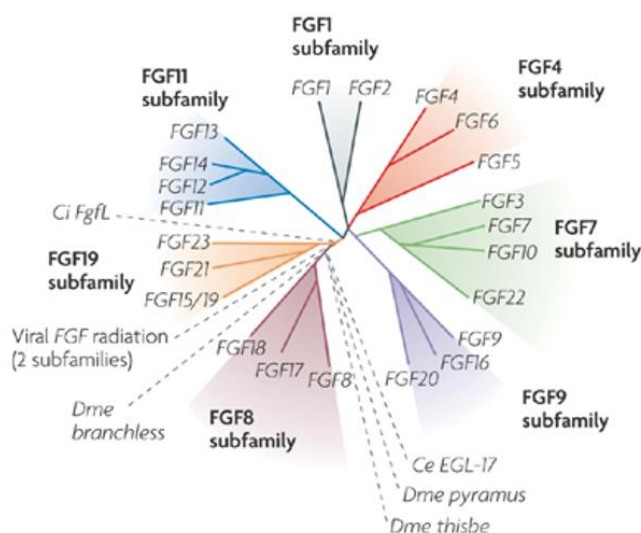


Figura 9. Filogenia de los genes de la familia FGF (Mason, 2007)

Llama la atención que, aunque sumen 22 miembros, contemos hasta con un FGF23. Esto se debe a que, si bien en ratón se ha descrito la presencia de FGF15, este no se encuentra en humanos, sino su ortólogo FGF19. De hecho, se han encontrado ortólogos para la mayoría de los FGFs humanos en otros vertebrados. Por ejemplo, en el caso de los ratones (*Mus musculus*), que ha sido el modelo animal utilizado durante esta tesis, los miembros de cada una de las 7 subfamilias tienen un alto grado de similitud de secuencia y comparten características estructurales y propiedades bioquímicas (Itoh and Ornitz, 2008).

2. CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LOS FGFs

2.1. Clasificación funcional de los FGFs

Los 22 componentes de la familia de los FGFs, a la que pertenece FGF21, pueden ser clasificados según actúen dentro de la célula, en el entorno de esta, o difundan por el organismo a través del torrente sanguíneo (Itoh and Ornitz, 2011).

2.1.1. Intracrinos

Estos FGFs no son secretados fuera de la célula que los produce, sino que actúan como moléculas intracelulares. En vez de interaccionar con los FGFRs, interaccionan con los dominios intracelulares de canales de sodio dependientes de voltaje y con las proteínas MAPK neuronales.

El único papel conocido de este tipo de FGFs, del que forman parte FGF11, 12, 13 y 14, es la regulación de la excitación eléctrica de las neuronas.

2.1.2. Paracrinos

Estas proteínas serán secretadas, pero actuarán sobre la propia célula que las ha producido o sobre sus vecinas. Para ello tendrán un péptido señal N-terminal que permitirá su secreción, además de un lugar de interacción con la molécula de heparán-sulfato. El heparán-sulfato no sólo mantendrá a los FGFs en la matriz extracelular (y por tanto en el entorno de la células sobre la que van a actuar) sino que además actuará como cofactor necesario para la correcta interacción con los FGFRs.

Su correcta interacción con dichos receptores desencadenará su dimerización y fosforilación, que llevarán a la activación de diversas vías de señalización. Algunos FGFs paracrinos pueden translocarse directamente al núcleo, actuando de forma intracrina. Forman parte de este grupo las subfamilias de FGF1/2/5, FGF3/4/6, FGF7/10/22, FGF8/17/18 y FGF9/16/20.

2.1.3. Endocrinos

Estos FGFs, a diferencia de los paracrinós, tienen baja afinidad por el heparán-sulfato, lo que les permite escapar del entorno celular hasta el torrente sanguíneo y actuar lejos de su lugar de origen.

Al no unirse a heparán-sulfato, necesitan otro cofactor para unirse y activar a los FGFRs. Estos cofactores son unas proteínas llamadas klotho, de las cuales existen varias formas de las que hablaremos más tarde.

Forman este grupo FGF15/19, FGF21 y FGF23. Estas proteínas actúan como factores de diferenciación de embriones y como hormonas en los adultos.

2.2. Los receptores de los FGFs

Estos péptidos ejercen sus efectos sobre las células uniéndose a unos receptores de tipo tirosina-quinasa situados en la membrana celular y que se conocen como FGFRs (*Fibroblast Growth Factor Receptors*) (Figura 10).

La unión de los FGF paracrinós a los complejos FGFR/Cofactor provoca la dimerización de los receptores y su auto fosforilación, seguida de la fosforilación de los substratos que forman parte de la cadena de transducción de la señal. Algunos de estos substratos son el FGFR2 α (Substrato de FGFR 2 α), PLC (Fosfolipasa C) o proteínas de la familia de las MAPKs como ERK1 y ERK2 (*Extracellular signal Regulated Kinase*) (cuya relación entre formas fosforiladas y no fosforiladas es utilizada para medir la respuesta de las células a la acción de proteínas como FGF21).

Estos receptores, compuestos por unos 800 aminoácidos, poseen un dominio citoplasmático que les da la actividad tirosina-quinasa propia de estos receptores. Presentan además un dominio transmembrana y tres dominios extracelulares (D1, D2 y D3) de unión a ligandos y a heparán sulfato.

A pesar de existir más de dos decenas de FGFs, los FGFRs están codificados por tan sólo cuatro genes (*FGFR1-4*) (Itoh and Ornitz, 2004). Sin embargo, mediante un fenómeno de *splicing* alternativo en el dominio D3 se generan dos isoformas, la b y la c, para cada uno de los cuatro receptores (FGFR1b/FGFR1c, FGFR2b/FGFR2c...), generando así una mayor variedad de receptores. Puesto que el D3 se encuentra en el dominio extracelular, este *splicing* otorgará a los receptores distintas especificidades de unión (Beenken and Mohammadi, 2009).

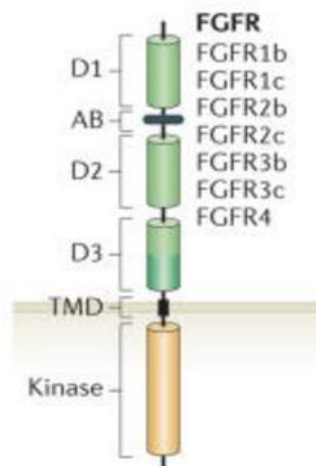


Figure 10. Esquema de un receptor de FGFs (FGFR). (Goetz and Mohammadi, 2013)

2.3. Los correceptores de los FGFs

Para que los FGFs sean capaces de inducir la dimerización de sus receptores requieren de la interacción con un correceptor. La afinidad que tenga cada FGF por los diferentes correceptores va a determinar si la diana de dicho péptido va a ser su propia célula productora o si se va a encontrar en otro órgano o tejido del cuerpo.

2.3.1. Los proteoglicanos

Todos los FGFs tienen la capacidad de interactuar con los proteoglicanos heparín y heparán sulfato, sin embargo, son los FGF clásicos (o paracrinos) van

a presentar una alta afinidad por estas moléculas presentes en la matriz extra y pericelular, sirviéndoles de cofactor y permitiendo que actúen en el entorno de la propia célula o tejido que los ha secretado.

La alta afinidad de los FGF paracrinicos por los proteoglicanos y su interacción con estos no sólo los mantiene cerca de su célula y de su tejido de origen, sino que además los resguarda y los mantiene protegidos de la desnaturalización térmica y la proteólisis. Además permite generar gradientes de FGFs en la matriz extracelular que participarán en procesos celulares como la migración, la proliferación o el destino de la célula durante el desarrollo embrionario y la morfogénesis tisular (Goetz and Mohammadi, 2013).

2.3.2. El cofactor β -Klotho

La subfamilia de los FGFs endocrinos, formada por FGF19 (15 en ratones), FGF21 y FGF23 se caracteriza por su baja afinidad por el heparán sulfato. Esto les permite alejarse del entorno celular y tisular y llegar hasta la circulación, actuando sobre otros tejidos y órganos.

Al no unirse a heparán sulfato, necesitarán interaccionar con otra proteína que haga el papel de cofactor. Lo harán interaccionando con unas proteínas transmembrana llamadas klotho, una familia de proteínas formada por tres componentes: α -klotho, β -klotho y *lactase-like* o γ -klotho.

El cofactor α -klotho (conocido también como klotho) se une a FGF23, mientras que β -klotho actúa como cofactor de FGF19/15 y de FGF21 (Kharitonov and Larsen, 2011). Existen estudios que indican que la proteína γ -klotho podría tener una función como correceptor adicional durante la señalización de FGF19/15 (Fon Tacer *et al.*, 2010).

Aunque los FGFRs se encuentran en las membranas celulares de muchos tejidos del organismo, es la presencia de los correceptores α y β -klotho la que da la especificidad tisular a los FGF endocrinos. El cofactor α -klotho se expresa principalmente en cerebelo, riñón y en los órganos reproductores. Mientras, β -

klotho (al que nos referiremos también por su abreviatura KLB) se encuentra en tejidos metabólicamente activos como hígado, páncreas, sistema nervioso central, corazón y en los tejidos adiposos blanco y marrón (Kurosu *et al.*, 2007; Fon Tacer *et al.*, 2010; Planavila, Redondo-Angulo and Villarroya, 2015).

Además de la presencia o no del correceptor en el tejido, también será importante la cantidad de este con respecto a la cantidad de FGFR. De hecho, cada receptor y cada isoforma de este presentan diferente afinidad hacia los diferentes correceptores. Por tanto, la capacidad para formar complejos FGF/FGFR/Klotho dependerá de la cantidad relativa de cofactor y de receptor así como de la isoforma de este (Kurosu *et al.*, 2007). Por ejemplo, los cofactores α - y β -klotho tienen predilección por los FGFR de isoformas c (Goetz and Mohammadi, 2013).

En el caso de FGF21, la formación de un complejo FGF21/FGFR/ β -klotho en los tejidos diana es necesaria para que esta hormona pueda actuar. Si el tejido no expresa este cofactor, la señalización y la propagación de la señal no serán posibles (Ding *et al.*, 2012; Owen, Mangelsdorf and Kliewer, 2015).

De hecho, la disminución de los niveles de KLB en los adipocitos causada por la presencia de citoquinas pro-inflamatorias disminuye su sensibilidad a FGF21 y produce una pérdida en los efectos farmacológicos de dicha hormona. Por el contrario, los agonistas de PPAR γ , como la rosiglitazona, son capaces de aumentar los niveles de KLB y de re-sensibilizar a las células a los efectos de FGF21 (Díaz-Delfín, Hondares, *et al.*, 2012).

3. FIBROBLAST GROWTH FACTOR-21 (FGF21)

En el año 2000 se describió por primera vez FGF21 (Nishimura *et al.*, 2000). Debido a su estructura fue incluido dentro de los *Fibroblast Growth Factors* (FGFs) (Ornitz and Itoh, 2001). Por su baja afinidad por el heparán sulfato se sitúa dentro de la subfamilia de los FGF endocrinos, adquiriendo un papel de

carácter hormonal (Kharitononkov *et al.*, 2008; Kharitononkov and Larsen, 2011). FGF21 fue descrita en humanos por primera vez en 2008 como proteína circulante (Chen *et al.*, 2008; Gälman *et al.*, 2008; Kharitononkov *et al.*, 2008). El FGF21 humano es un polipéptido de 181 aminoácidos y que comparte un 81% de la secuencia con su ortólogo en ratón.

La mayoría de los estudios sobre FGF21 se han llevado a cabo en animales, principalmente en ratones, por lo que nuestros conocimientos sobre su papel y su importancia en humanos son limitados. En roedores FGF21 se expresa principalmente en hígado (Nishimura *et al.*, 2000), en testículos (Wente *et al.*, 2006), en tejido adiposo blanco y marrón (Muisse *et al.*, 2008; Hondares *et al.*, 2011) y, en menor medida, en músculo esquelético (Ribas *et al.*, 2014) y en corazón (Planavila *et al.*, 2015; Planavila, Redondo-Angulo and Villarroya, 2015).

3.1. Regulación de la producción de FGF21 en el hígado

3.1.1. Inducción de FGF21 durante el ayuno

Los FGFs endocrinos adquieren las funciones de hormonas cuyo deber es mantener estados metabólicos mediante la regulación de la homeostasis de múltiples factores como los ácidos grasos, la glucosa o los ácidos biliares (Giralt, Gavaldà-Navarro, & Villarroya, 2015).

Una de las funciones más ampliamente descritas de FGF21 es su regulación de la respuesta al ayuno, induciendo la oxidación de ácidos grasos y la producción de cuerpos cetónicos. Esta respuesta está mediada por el receptor de ácidos grasos PPAR α , ya que la secuencia promotora del gen de *FGF21* posee un elemento de unión a PPARS (PPRE) que es activado durante el ayuno por el complejo PPAR α -Ácidos grasos libres-RXR, de la forma que se explica a continuación: en condiciones de ayuno se incrementan los niveles circulantes de cuerpos cetónicos y los de ácidos grasos libres procedentes de la lipólisis. Los ácidos grasos o sus derivados se unirán a receptores PPAR α que serán internalizados y desplazados al núcleo, asociándose con receptores RXR y

formando los complejos PPAR α -AGL-RXR capaces de unirse a los elementos PPRE del gen de *FGF21* y activando su transcripción (Badman *et al.*, 2007; Lundåsen *et al.*, 2007). (Figura 11).

Además, FGF21 puede controlar la gluconeogénesis mediante la activación del coactivador transcripcional PGC-1 α , que se encarga de regular la expresión de varios genes gluconeogénicos en el hígado (Potthoff *et al.*, 2009); aunque otros estudios realizados en ratones KO para dicho coactivador indican que FGF21 podría regular la sobreexpresión de los genes gluconeogénicos sin la necesidad de PGC-1 α como mediador (Fisher *et al.*, 2011).

Se ha observado que la inducción de FGF21 en el hígado como respuesta al ayuno también está regulada por otra ruta independiente de la de PPAR α que tendría lugar mediante la señalización glucagón–PKA. (Badman *et al.*, 2007; Iizuka, Takeda and Horikawa, 2009). En el marco de esta misma investigación se observó como FGF21 puede ser inducido en condiciones de excesiva ingesta calórica gracias a la presencia en su promotor de un elemento de respuesta a carbohidratos (ChoRE), el cual responde a la activación de la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos ChREBP (Figura 11).

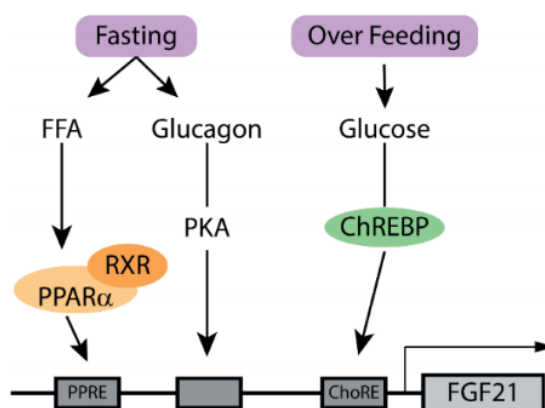


Figura 11. Esquema de la regulación de la expresión de FGF21 en hígado como respuesta al ayuno y a una excesiva ingesta de alimentos. (Uebanso *et al.*, 2011)

La mencionada respuesta de FGF21 ante el ayuno es diferente en humanos y en ratones. En caso de los ratones, se obtiene un aumento significativo del FGF21 circulante con tan sólo 12 horas de ayuno. Sin embargo, en humanos, no

se observa esta respuesta frente al ayuno, no al menos con tanta rapidez, ya que hacen falta 7 días para realizar la misma observación en individuos de nuestra especie (Fazeli *et al.*, 2015).

3.1.2. Comunicación entre el hígado y el tejido adiposo marrón

Como volveremos a ver en el apartado dedicado a los efectos de FGF21 sobre el tejido adiposo marrón, la inducción de la producción de FGF21 en el hígado a través de PPAR α no sólo se da en situaciones de ayuno. En ratones neonatos los ácidos grasos libres procedentes de la leche materna también activan esta vía aumentando la concentración de FGF21 en plasma. Este aumento de FGF21, junto al cambio de temperatura que se da al pasar del medio intrauterino al extrauterino, produce la activación del programa termogénico en el tejido adiposo marrón (Hondares *et al.*, 2010).

Este eje hígado-TAM permitiría regular y sincronizar la activación de la termogénesis adaptativa a la ingesta de alimentos: los ratones neonatos necesitan activar el TAM para adaptarse a la temperatura del medio extrauterino, sin embargo, el uso de sustratos metabólicos para este fin sin que hubieran comenzado a alimentarse supondría una muerte probable para ellos.

3.1.3. Efectos farmacológicos de FGF21 sobre el hígado

Hay varios estudios en los que se ha estudiado el papel del hígado en el desarrollo de los efectos beneficiosos asociados a los tratamientos farmacológicos con FGF21.

Cuando se ha procedido a la administración de FGF21 recombinante en modelos de ratones genéticamente obesos (ob/ob), se ha observado una mejora en la glucemia de estos tras el ayuno. En este caso FGF21 actuaría sobre el flujo de la glucosa hepática, mejorando la sensibilidad a insulina (Berglund *et al.*, 2009).

Por su parte, en estudios en los que se han realizado tratamientos crónicos con FGF21 en ratones obesos se ha conseguido revertir el hígado graso gracias a la

inhibición de la proteína de unión al elemento regulador de estero 1 (SREBP-1), un factor muy importante en la lipogénesis (Xu *et al.*, 2009).

En tratamientos crónicos con FGF21 realizados en ratas con obesidad inducida por la dieta se ha conseguido inhibir la producción de glucosa hepática y la expresión de genes gluconeogénicos (Sarruf *et al.*, 2010).

3.2. Efectos y regulación de FGF21 en el tejido adiposo blanco

El tejido adiposo, tanto el blanco como el marrón, es una de las principales dianas de FGF21. Sin embargo, aunque esta hormona es producida principalmente por el hígado, el tejido adiposo también es capaz de producirla y liberarla para que ejerza, probablemente, acciones autocrinas y paracrinas.

En el caso del tejido adiposo blanco, se ha observado que hay producción de FGF21 en el caso de ratones. En los humanos la producción de FGF21 por parte de los adipocitos blancos no está clara. Aunque se ha detectado su producción y liberación al medio en adipocitos humanos en cultivo, no se ha detectado su expresión en biopsias de TAB.

Actualmente se considera que los efectos beneficiosos de FGF21 sobre el metabolismo se deben en su mayoría a su acción sobre el tejido adiposo.

3.2.1. Sobre el metabolismo de la glucosa

En el tejido adiposo, tanto blanco como marrón, la expresión de FGF21 es estimulada por el receptor PPAR γ y por sus agonistas, tanto naturales, como los ácidos grasos, como artificiales, como los fármacos de sensibilización a la insulina como las tiaglitazonas (como la rosiglitazona o la pioglitazona).

El principal efecto de FGF21 sobre el tejido adiposo es el de estimular la captación de glucosa de una manera independiente de la insulina. La insulina estimula la captación de glucosa promoviendo la translocación a la membrana

celular de las vesículas que contienen el transportador de glucosa GLUT4. Por el contrario, FGF21 produce un aumento de GLUT1, un transportador de glucosa independiente de insulina (Kharitonkov *et al.*, 2005). Aunque GLUT1 no dependa de la insulina, se ha observado un efecto aditivo de FGF21 e insulina en el aumento de la captación de glucosa cuando ambas moléculas son inyectadas a la vez en ratones obesos, produciendo una mayor disminución de la insulina cuando se administran juntas que cuando se inyecta sólo insulina (Kharitonkov *et al.*, 2005).

Estos efectos de FGF21 sobre la captación y la oxidación de glucosa en el tejido adiposo son los que han llevado a considerarla como una molécula con propiedades anti-diabéticas.

Se ha observado también que el elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP) presente en la secuencia promotora de FGF21 (el cual es estimulado durante la diferenciación de los adipocitos) es capaz de aumentar los niveles de FGF21 durante la diferenciación de la misma manera que sucede durante la estimulación con agonistas PPAR γ (He *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008).

3.2.2. Sobre el metabolismo lipídico

Inicialmente, se describió a FGF21 como una hormona inductora de la lipólisis (Inagaki *et al.*, 2007), pero estudios posteriores han descrito un efecto inhibitor sobre la lipólisis en adipocitos humanos (Arner *et al.*, 2008). Además, en ratones se ha observado como FGF21 puede inhibir la lipólisis inducida por la hormona de crecimiento (GH), la cual es liberada por la hipófisis como respuesta al ayuno (Chen *et al.*, 2011). Estas observaciones contradictorias hacen que todavía no esté claro qué papel ejerce FGF21 sobre la lipólisis.

En estudios *in vitro* con células 3T3-L1, se ha observado como el tratamiento con FGF21 recombinante junto a rosiglitazona es capaz de aumentar la actividad transcripcional de PPAR γ , lo que promueve la expresión de β -klotho, haciendo que aumente la degradación de triglicéridos en los adipocitos. (Cuevas-Ramos,

Aguilar-Salinas and Gómez-Pérez, 2012). (Kharitononkov *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011)

Durante la alimentación PPAR γ estimula la producción de FGF21 en los adipocitos, pero no en el hígado, generando un bucle cerrado en el que FGF21 actúa de forma autocrina sobre los propios adipocitos, amplificando los efectos de PPAR γ y favoreciendo que los adipocitos blancos lleven a cabo su función de acumular triacilglicerol (Dutchak *et al.*, 2012).

3.2.3. Sobre la producción y secreción de adipoquinas

FGF21 le hará llegar a los adipocitos información sobre el estado nutricional del organismo para que este produzca y secrete las adipoquinas necesarias en cada momento.

En diferentes estudios se ha observado como FGF21 está implicado en la regulación de los niveles de leptina y adiponectina, disminuyendo los niveles de la primera e incrementando los de la segunda.

En estudios realizados in vitro se ha observado como los tratamientos con FGF21 recombinante son capaces de aumentar los niveles de expresión de secreción de adiponectina. Pero, además, muchos de los efectos terapéuticos que se observan al inyectar FGF21 recombinante en ratones obesos (como la bajada de la glucemia, el aumento de la sensibilidad a la insulina o la disminución en el contenido de grasa hepática) se pierden cuando los animales son knock-out para el gen de la adiponectina (Lin *et al.*, 2013).

3.3. Efectos de FGF21 sobre el tejido adiposo marrón

Los efectos de FGF21 sobre el metabolismo glucídico y lipídico que se han descrito para el TAB también se producen en el TAM. Sin embargo, debido a la naturaleza termogénica de este tejido, FGF21 va a realizar más funciones sobre el TAM.

El tejido adiposo marrón es capaz de producir y secretar FGF21, siendo considerada incluso una batoquina, es decir, una citoquina producida por el tejido adiposo marrón (Villarroya *et al.*, 2016)

Tanto *in vivo*, exponiendo a ratones a frío, como *in vitro*, tratando adipocitos marrones con agonistas β -adrenérgicos, se produce un potente aumento en la expresión y producción de FGF21 por parte de los adipocitos marrones. Esta inducción viene regulada por AMPc, ya que el promotor del gen FGF21 tienen un lugar CRE de respuesta a este metabolito (Hondares *et al.*, 2011).

Aunque se conoce que la producción de FGF21 por parte de los adipocitos marrones ante un estímulo noradrenérgico tiene una función en la inducción de la termogénesis del TAM y en la inducción del *browning* (Fisher *et al.*, 2012), no está claro si esta es ejercida de forma autocrina o a través del sistema nervioso central, como una forma de aumentar el pool de FGF21 circulante que lleve al cerebro a mandar una señal nerviosa que active el TAM. Existen pruebas de este papel del SNC en la inducción del programa termogénico (Owen *et al.*, 2014), sin embargo, el posible papel autocrino de FGF21 requiere más investigaciones.

Además, FGF21 es un factor clave en la adaptación al frío en ratones neonatos. La alta concentración de ácidos grasos libres que contiene la leche materna hace que aumente la expresión de PPAR α en el hígado, lo que promoverá la expresión de FGF21, aumentando sus niveles circulantes y activando el programa termogénico en el TAM (Hondares *et al.*, 2010).

3.4. Efectos de FGF21 sobre el *browning*

Como se describe en el capítulo sobre la adipogénesis, cuando la exposición al frío se prolonga, se produce *browning* en el tejido adiposo blanco, dotándose este de propiedades termogénicas. Actualmente existen evidencias de que FGF21 está involucrado en este fenómeno (Fisher *et al.*, 2012). Al igual que en el caso del TAM, no se sabe si esta acción de FGF21 es autocrina o está mediada por el sistema nervioso central.

Un capítulo de esta tesis se dedica a investigar ese posible papel autocrino de FGF21 tanto en el proceso de *browning* del TAB como en la activación de la termogénesis en el TAM.

3.5. Estados de resistencia a FGF21 en patologías metabólicas

En diferentes estudios se han observado niveles circulantes de FGF21 más altos en estados patológicos relacionados con el síndrome metabólico como la obesidad y la diabetes tipo II (Dushay *et al.*, 2010). En estos casos, los niveles de FGF21 llegan a correlacionar con la gravedad de la dolencia (Gallego-Escuredo *et al.*, 2015). Estos hechos irían en consonancia con la teoría que Fisher y su equipo lanzaron en 2010 al definir la obesidad como un estado de resistencia a FGF21. Igual que ocurre con la leptina y con la insulina en la obesidad, cuando las células dejan de responder a estas hormonas y el tejido adiposo y el páncreas (respectivamente) se ven obligados a aumentar la producción de estas (Fisher *et al.*, 2010). Pese a ello, el tratamiento farmacológico con FGF21 o análogos en ratones y en humanos obesos tiene efectos beneficiosos sobre el metabolismo (Gaich *et al.*, 2013), lo que provoca que exista cierta controversia con respecto a la teoría de la resistencia a FGF21.

Como se explicó anteriormente, para que FGF21 pueda actuar sobre sus tejidos diana se requiere la presencia de su correceptor β -klotho (KLB). La cantidad de KLB disminuye en los tejidos diana tanto de ratones como de humanos obesos (Gallego-Escuredo *et al.*, 2015). Este descenso podría relacionarse con el hecho de que tanto la liberación de citoquinas inflamatorias como el estrés de retículo, fenómenos ambos característicos de la obesidad, son capaces de disminuir tanto la expresión génica como la cantidad de KLB en la superficie celular y de comprometer la respuesta de los tejidos diana a los efectos de FGF21 (Díaz-Delfín, Hondares, *et al.*, 2012). Es por eso que actualmente se considera la bajada en los niveles de β -klotho como una posible causa de la resistencia a FGF21.

Pero estas observaciones no sólo se dan en la obesidad y en la diabetes tipo II. Los pacientes de VIH presentan niveles anormalmente altos de FGF21 circulante, los cuales son aún mayores entre aquellos que siguen la terapia antirretroviral y aún más entre quienes han desarrollado lipodistrofia (Domingo *et al.*, 2010; Gallego-Escuredo *et al.*, 2012; Srinivasa *et al.*, 2015). Entre estos pacientes también se ha observado un descenso en los niveles de KLB (Gallego-Escuredo *et al.*, 2012). Es por eso que se considera plausible la existencia de un estado de resistencia a FGF21 también en pacientes de VIH, lo cual podría guardar relación con el hecho de que desarrollen dolencias normalmente asociadas a la obesidad, como dislipemias y resistencia a la insulina (F Villarroya, Domingo and Giralt, 2007).

BLOQUE III - EFECTOS DE LA INFECCIÓN POR VIH Y SU TRATAMIENTO SOBRE EL TEJIDO ADIPOSO

1. LAS LIPODISTROFIAS

Las lipodistrofias representan un grupo de patologías del tejido adiposo muy variado y heterogéneo. Se caracterizan por una pérdida total o parcial del tejido adiposo o por una redistribución de este (Garg, 2011).

1.1. Clasificación y tipos

La magnitud y la localización de la pérdida de tejido adiposo varía enormemente entre lipodistrofias, pero en la mayor parte de casos estas patologías están relacionadas con el desarrollo de alteraciones metabólicas graves como la aparición de resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa y dislipemias (Vigouroux *et al.*, 2011). De hecho, la gravedad de la dolencia se correlaciona con la cantidad de tejido adiposo ausente. Es por eso que las lipodistrofias generalizadas, aquellas que conllevan una pérdida de tejido adiposo en prácticamente todos los depósitos, son las más graves.

Por otro lado, las lipodistrofias parciales implican la pérdida de grasa (lipoatrofia) sólo en algunas regiones del cuerpo, como en las extremidades. En estos casos es muy común que se produzcan acumulaciones en otras regiones como mecanismo compensatorio.

Finalmente, las formas más leves serán las lipodistrofias localizadas, que implican la pérdida de tejido adiposo únicamente en zonas discretas y definidas (Garg, 2011).

Las lipodistrofias pueden tener diferentes orígenes, pueden ser innatas o

adquiridas. Las innatas son lipodistrofias de origen genético, hereditarias, causadas por mutaciones. Las lipodistrofias adquiridas tienen orígenes muy variados como puedan ser eventos autoinmunes o debidos a la toxicidad de ciertos fármacos (Vigouroux *et al.*, 2011).

1.2. Fisiopatología de las lipodistrofias

Podemos decir que, yendo a la esencia de la enfermedad, los diferentes tipos de lipodistrofia tienen en común la incapacidad de almacenar correctamente las reservas adiposas, ya sea por un almacenamiento defectuoso o deficitario de los triacilglicerolos dentro de las vesículas lipídicas o por la imposibilidad de disponer de adipocitos correctamente diferenciados. El hecho de no poder almacenar correctamente los lípidos conlleva la aparición de fenómenos de lipotoxicidad, los cuales conducen a un incremento en el estrés oxidativo, del estrés de retículo y favorecen el desarrollo de resistencia a la insulina.

El tejido adiposo es el principal afectado por las lipodistrofias, sin embargo, otros órganos pueden sufrir las consecuencias. La incorrecta acumulación de lípidos por parte del tejido adiposo lleva a la acumulación (o más bien infiltración) de estos en otras zonas como el hígado, el músculo esquelético o el páncreas. Esta acumulación ectópica de lípidos supone un grave problema metabólico ya que contribuye al desarrollo de dolencias graves como la diabetes tipo II o la esteatosis hepática. Estas son enfermedades que se han asociado normalmente con el exceso de acumulación de tejido adiposo que se da en la obesidad pero que, paradójicamente, aparecen también cuando esta acumulación es defectuosa.

Al poner de manifiesto que el exceso y la falta de tejido adiposo son en realidad dos caras de la misma moneda, el estudio de los mecanismos fisiopatológicos de las lipodistrofias ha permitido investigar y comprender puntos clave de la biología del tejido adiposo humano que han aportado conocimientos que pueden ser clave para combatir la epidemia de obesidad y de diabetes tipo II que sufren las sociedades modernas.

1.3. Lipodistrofia asociada a la infección por VIH y al tratamiento antirretroviral

En la actualidad la forma más común de lipodistrofia es la asociada a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1), causante (en el caso de que la replicación del virus no sea controlada con fármacos o por el propio organismo) del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

Este virus se identificó durante la década de los ochenta al investigar una misteriosa epidemia que se extendía rápidamente entre los colectivos homosexuales. La infección por este virus, incluso antes de evolucionar al sida, se correlacionaba con elevadas tasas de mortalidad y morbilidad. Afortunadamente durante los años posteriores la introducción de fármacos antirretrovirales permitió controlar en gran medida la infección y mejorar la calidad de vida de los pacientes, sobre todo tras la introducción de un régimen de terapia combinada conocido como tratamiento antirretroviral de alta actividad (HAART, *highly active antiretroviral therapy*) (Klimas, Koneru and Fletcher, 2008).

La introducción de la terapia antirretroviral ha sido uno de los mayores logros de la historia de la medicina contemporánea, al convertir una enfermedad mortal en una dolencia crónica. Sin embargo, durante la década de los 90 se reportó que algunos pacientes sufrían un síndrome con pérdida de grasa en algunas regiones y acumulación en otros. Este trastorno, que se clasificó como una forma de lipodistrofia adquirida y parcial, fue denominada como lipodistrofia asociada a la infección por VIH-1 y al tratamiento HAART (*HALS, HIV-1- and HAART-associated lipodystrophy syndrome*) (Carr *et al.*, 1998).

1. Unión del virus a la superficie celular:

El virus se unirá a la superficie celular a través del contacto de una proteína de la membrana del VIH-1 con su receptor, la molécula CD4 del linfocito. Esta unión permitirá una segunda interacción con un receptor de quimiocinas, normalmente con CCR5 o CXCR4, que actuará como correceptor para asegurar el anclaje del virus. El anclaje a la célula mediante estos receptores permitirá la fusión de su membrana con la membrana plasmática del linfocito, permitiendo el acceso del virión al interior de la célula.

2. Retrotranscripción:

Cuando el virión ha entrado dentro del linfocito se produce la liberación del ARN y de las proteínas de la cápsida. Una de estas proteínas es una polimerasa muy especial, se trata de una transcriptasa reversa, una polimerasa capaz de convertir el ARN del virus en ADN.

3. Integración:

El material genético del virus, ya convertido en ADN por la transcriptasa reversa, se trasladará al núcleo y será integrado en el genoma de la célula huésped por acción de otra proteína procedente del virus, la integrasa.

4. Transcripción y ensamblaje:

Una vez el material genético del VIH-1 se ha integrado en el genoma de la célula huésped en forma de provirus, se podrá dar la transcripción del genoma del VIH-1 y de sus proteínas. Las proteínas de la cápsida se ensamblarán, guardando en su interior el genoma vírico (en forma de ARN de doble cadena) y los enzimas necesarios para entrar en otra célula e integrar su genoma en esta. Una vez se han ensamblado las piezas, los viriones abandonan la célula por gemación y quedan rodeados de la membrana de la célula huésped.

5. Maduración:

Algunas de las proteínas víricas se traducen como pro-proteínas que requieren de modificaciones post-traduccionales. Una vez ya se ha ensamblado la cápsida y el virus sale de la célula huésped, uno de los enzimas víricos, la proteasa del VIH-1, procesará estas pro-proteínas, llevando a la maduración de los viriones y preparándolos para infectar una nueva célula.

Este ciclo replicativo requiere una alta capacidad metabólica por parte del linfocito, produciéndole una fuerte desgaste de sus recursos metabólicos que, en último término, lo llevarán hasta la muerte. Esto produce la disminución de los linfocitos y la inmunodeficiencia que da nombre a la enfermedad (Klimas, Koneru and Fletcher, 2008; Smith *et al.*, 2013).

2.2. La terapia HAART

El VIH-1 es un virus con una alta capacidad de mutación y, por consiguiente, adquiere resistencias a fármacos con relativa facilidad. Esto llevó a establecer de regímenes terapéuticos combinados, es decir, a tratar a los pacientes simultáneamente con varios fármacos pertenecientes a diferentes clases. Al hablar de clases de fármacos nos referimos a la clasificación que hacemos de estos en función de qué etapas particulares del ciclo replicativo del VIH-1 tienen como diana. Se suelen combinar tres fármacos de al menos dos clases diferentes, lo que propicia un efecto sinérgico y evita la aparición de resistencias.

Aunque este tratamiento ha permitido convertir una enfermedad mortal en una infección crónica (en la que los niveles del virus llegan a ser indetectables), este tratamiento tiene graves efectos adversos como hepatotoxicidad, trastornos gastrointestinales, problemas cutáneos, óseos, cardiovasculares y las ya mencionadas alteraciones de la biología del tejido adiposo (Klimas, Koneru and Fletcher, 2008)

2.2.1. Clasificación de los fármacos de la terapia HAART

Actualmente existen seis clases diferentes de fármacos antirretrovirales:

1. Inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de nucleósidos o nucleótidos (NRTI):

Actúan como inhibidores competitivos de la transcriptasa reversa. Es decir, se unen a su centro activo e impiden la retrotranscripción del ARN vírico a ADN.

Los fármacos más importantes de esta familia son **Estavudina, Didanosina, Zidovudina, Abacavir y Tenofovir**.

2. Inhibidores de la transcriptasa reversa no análogos de nucleósidos o nucleótidos (NNRTI):

También inhiben la transcriptasa reversa pero de forma no competitiva, es decir, no se unen al centro activo. Se unen a otra región de la transcriptasa, cambiando su estructura terciaria y disminuyendo su actividad.

Dentro de esta familia se sitúan **Efavirenz, Nevirapina y Rilpivirina**.

3. Inhibidores de la proteasa (PI):

Bloquean el centro activo de la proteasa, impidiendo que se procesen las proproteínas virales, generando viriones sin capacidad para infectar otras células.

Indinavir, Lopinavir, Ritonavir, Nelfinavir, Atazanavir y Darunavir son miembros importantes de esta familia de fármacos.

4. Inhibidores de la integrase (INSTI):

Impiden que el ADN del virus se inserte en el genoma de la célula huésped.

Forman parte de esta familia **Dolutegravir, Raltegravir y Elvitegravir**

5. Inhibidores de la fusión/entrada (EI):

Impiden que el virus se una a su receptor y sus correceptores de la membrana de la célula huésped, impidiendo así su entrada.

Estos fármacos son de los más nuevos y entre ellos se encuentran **Maraviroc** y **Enfuvirtida**.

6. Inhibidores de la maduración:

Bloquean el procesamiento de las proproteínas virales uniéndose al sitio donde se uniría la proteasa. Son similares a los PI, pero en vez de atacar a la proteasa compiten con ella por el lugar de unión a las proproteínas.

Dentro de estos fármacos encontramos el **Bevirimat**.

3. LA LIPODISTROFIA ASOCIADA A LA INFECCIÓN POR EL VIH Y A LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

3.1. Sintomatología de la HALS

La HALS (*HIV-1- and HAART-associated lipodystrophy síndrome*) es un tipo de lipodistrofia parcial caracterizado por una pérdida de tejido adiposo subcutáneo, principalmente en la cara, las extremidades y en la zona de los glúteos. A esta pérdida de tejido adiposo se la denominada lipoatrofía. Al mismo tiempo, los depósitos viscerales y mamarios aumentan su masa adiposa (lipohipertrofia). En algunos pacientes aparecen también acumulaciones de grasa en el cuello y en la zona dorsocervical, apareciendo los fenómenos conocidos como "cuello de rana" (Bullfrog neck) y "giba de búfalo" (BH, buffalo hump) respectivamente (Lo *et al.*, 1998; Tierney and Hanke, 2010). En estos pacientes también pueden aparecer otros lipomas ubicados en diferentes partes del cuerpo, fenómeno que se conoce como lipomatosis (F Villarroya, Domingo and Giralt, 2007; Guaraldi *et al.*, 2007). Al contrario que las regiones lipoatróficas, los lipomas de tipo BH no

presentan signos de inflamación local ni de inhibición de la adipogénesis, además expresan genes propios de adipocitos termogénicamente activos (Guallar *et al.*, 2008).

Uno de los principales problemas asociados a la terapia HAART y que puede tener una influencia sobre la calidad de vida de estos pacientes es que, además de estas alteraciones morfológicas, los pacientes con HALS suelen presentar trastornos metabólicos sistémicos similares a los que aparecen en personas obesas. Algunos de ellos son muy preocupantes, como el desarrollo de dislipemia (caracterizada por una hipertriglicidemia y unos elevados niveles circulantes de ácidos grasos no esterificados), y el desarrollo de resistencia a la insulina, fenómenos ambos que se correlacionan a su vez con un riesgo elevado de padecer enfermedades cardiovasculares (Villarroya, Domingo and Giral, 2010).

Al igual que sucede en la obesidad, en la lipodistrofia asociada al VIH y a la terapia antirretroviral hay una alteración en los niveles circulantes de adipoquinas, incluyendo los de leptina y adiponectina, las adipoquinas más importantes y que son claves en la regulación del metabolismo. Los niveles circulantes de leptina se correlacionan con la adiposidad, por lo que, a diferencia del caso de los individuos obesos, en los pacientes con HALS los niveles de leptina son más bajos (Paruthi, Gill and Mantzoros, 2013). Por otro lado, los niveles de adiponectina se encuentran disminuidos tanto en pacientes obesos como en pacientes que padecen HALS.

La HALS y la obesidad también tienen en común un fuerte aumento de los niveles circulantes de FGF21 (Domingo *et al.*, 2010; Gallego-Escuredo *et al.*, 2012). Debido a los bajos niveles de expresión de esta adipoquina en el tejido adiposo blanco y beige humano, el origen de este incremento en FGF21 sería principalmente hepático y debido a los daños que la infiltración de lípidos y que la propia terapia HAART producen en este órgano. Sin embargo este incremento podría deberse al desarrollo de un estado de resistencia a FGF21 similar al que se observa en la obesidad (Fisher *et al.*, 2010). En los pacientes con HALS, al igual que en los obesos, hay una disminución del correceptor de FGF21 β -klotho

(Gallego-Escuredo *et al.*, 2012, 2015), la cual podría ser la causante de dicha resistencia. La expresión de este correceptor se ve comprometida en los adipocitos en situaciones de estrés tales como inflamación y estrés de retículo (Díaz-Delfín, Hondares, *et al.*, 2012), situaciones ambas a las que están sometidos los adipocitos tanto en los obesos como en quienes siguen la terapia HAART.

3.2. Bases moleculares de la HALS

Los primeros casos de este tipo de lipodistrofia aparecieron al mismo tiempo que se introducía la primera generación de PI en los regímenes HAART. Por este motivo, inicialmente se les consideró causantes de estas alteraciones en el tejido adiposo. Sin embargo, gracias al trabajo de cientos de investigadores durante las últimas dos décadas, sabemos que la HALS aparece debido a una compleja combinación de factores que se dan en los pacientes y que serán analizadas una a una.

3.2.1. Alteraciones en la adipogénesis

La gran mayoría de estudios realizados en biopsias de tejido adiposo de pacientes indican que el principal mecanismo que contribuye al desarrollo HALS es una alteración en la adipogénesis relacionada con cambios en la expresión de genes clave para la correcta diferenciación de los adipocitos (Giralt *et al.*, 2006).

En el caso de los estudios *in vitro*, se ha observado cómo tanto los PI como varios NRTI e incluso los NNRTI efavirenz y rilpivirina son capaces de inhibir la adipogénesis en varias líneas de adipocitos y en cultivos primarios humanos y de ratón (Caron *et al.*, 2004; El Hadri *et al.*, 2004; Pacenti *et al.*, 2006; F Villarroya, Domingo and Giralt, 2007; Gallego-Escuredo *et al.*, 2010; Díaz-Delfín *et al.*, 2011; Díaz-Delfín, Domingo, Mateo, *et al.*, 2012). En estos estudios se observó una disminución en la expresión de *PPAR γ* , arrastrando a una reducción en la expresión de los genes regulados por este factor de transcripción como los que codifican las proteínas LPL, GLUT4 y adiponectina, hecho que va en

consonancia con la caída en los niveles circulantes de la misma (Giralt *et al.*, 2006).

Podemos decir pues que tanto los estudios in-vitro como los estudios llevados a cabo con biopsias de pacientes con HALS son coherentes y muestran como la represión de la expresión de los genes relacionados con la adipogénesis contribuye de forma muy notable a explicar las bases moleculares del desarrollo de esta patología.

3.2.2. Toxicidad mitochondrial

Cuando se reportaron los primeros fenómenos de toxicidad mitocondrial, asociada sobre todo a los NRTI, se postuló que este fenómeno podría ser el culpable de la lipoatrofia asociada a la HALS.

Puesto que el ADN mitocondrial (ADNmt) codifica componentes indispensables de la cadena transportadora de electrones, los daños en este son muy perniciosos para el metabolismo energético. De hecho, el grado de lipoatrofia en los individuos bajo tratamiento HAART se correlaciona con una disminución del ADNmt que puede ser revertida si se reduce el uso de NRTI en el tratamiento (Boyd *et al.*, 2006).

Esta bajada en el ADNmt trae consigo una reducción en la expresión de los genes mitocondriales que conduce a una alteración en la función de este orgánulo, disminuyendo la producción de ATP e incrementando la de ROS. Este proceso lleva a la célula a una situación de estrés oxidativo que puede desembocar en la inhibición de la diferenciación de los adipocitos, la inducción de vías inflamatorias ya la activación de rutas pro-apoptóticas (Francesc Villarroya, Domingo and Giralt, 2007).

Esta depleción del ADNmt podría deberse a la inhibición de la ADN polimerasa y por parte de estos fármacos debido a una competencia con los nucleótidos trifosfato. La polimerasa es específica de las mitocondrias y participa en la síntesis y reparación del ADNmt. Un funcionamiento incorrecto de esta

polimerasa conduciría a una disminución en la síntesis y reparación del ADNmt y explicaría estas alteraciones mitocondriales (Francesc Villarroya, Domingo and Giralt, 2007).

3.2.3. Efectos producidos por la propia infección

Los denominados pacientes *naïve*, aquellos que están infectados por VIH-1 pero que aún no han comenzado a recibir tratamiento, presentan ya algunas de las alteraciones propias de la HALS, como la represión de la expresión de genes clave en la adipogénesis como *PPAR γ* y *C/EBP α* . Esto sugiere que el la propia infección por el VIH-1 tiene un papel importante en el desarrollo de la lipodistrofia (Peck *et al.*, 1993; Giralt *et al.*, 2006; F Villarroya, Domingo and Giralt, 2007).

Tanto en estudios realizados in vitro, con líneas de adipocitos, como en estudios con modelos animales que expresan proteínas víricas, se ha observado como algunas proteínas del virus son capaces de inhibir la expresión de *PPAR γ* , inhibiendo por tanto la adipogénesis (Otake *et al.*, 2004; Shrivastav *et al.*, 2008; Villarroya *et al.*, 2010; Díaz-Delfín, Domingo, Wabitsch, *et al.*, 2012).

Se ha especulado que estos efectos directos de la infección sobre el tejido adiposo se debieran a que el VIH-1 fuera capaz de infectar a los propios adipocitos, ya que estas células expresan el receptor y los principales correceptores del VIH-1 (CD4, CCR5 y CXCR4) (Hazan *et al.*, 2002; Maurin *et al.*, 2005). También se baraja la hipótesis de que sean las células inmunes infiltradas en el tejido adiposo quienes sean infectadas por el virus y que las alteraciones producidas en estas sean las causantes de estos fenómenos (F Villarroya, Domingo and Giralt, 2007).

3.2.4. Inflamación del tejido adiposo

El tejido adiposo de los pacientes con HALS desarrolla un proceso inflamatorio, algo que también sucede en la obesidad. Este proceso inflamatorio es iniciado por la presencia de la infección viral y aumentado por la terapia HAART (sobre todo por el efecto de los PI y de los NRTI). Esta inflamación provoca la liberación

de citoquinas proinflamatorias como MCP-1 y TNF α (F Villarroya, Domingo and Giralt, 2007), capaces de inhibir la adipogénesis y de activar rutas de apoptosis en los adipocitos.

Otra de las citoquinas proinflamatorias producida por los adipocitos en este ambiente es la IL-6, capaz de inducir un aumento en la lipólisis. Algunos estudios han apuntado a la inducción de la lipólisis como otro posible mecanismo implicado en la HALS. Aunque este aumento se observa independientemente del tratamiento, los PI son los que contribuyen con más fuerza (F Villarroya, Domingo and Giralt, 2007).

3.2.5. Senescencia celular

El envejecimiento está relacionado con una distribución del tejido adiposo, un aumento del estrés oxidativo y un estado basal de inflamación del tejido adiposo. Por eso se ha propuesto que en la etiopatología de la HALS también podrían tener un papel importante procesos de senescencia celular (Caron-Debarle *et al.*, 2010).

Esta hipótesis es apoyada por estudios que han detectado altas cantidades de prelamina A en las áreas lipoatróficas de pacientes con lipodistrofia asociada a la terapia HAART. La prelamina A es una forma mal procesada y tóxica de la proteína lámina A cuya acumulación relaciona con procesos de envejecimiento celular (Coffinier *et al.*, 2007; Caron-Debarle *et al.*, 2010; Béréziat *et al.*, 2011)..

3.2.6. Estrés de retículo endoplasmático

La HALS se ha asociado también a la inducción de fenómenos de estrés de retículo endoplasmático en los adipocitos. El estrés de retículo es un fenómeno que se da en las células cuando la capacidad de plegamiento de proteínas del retículo endoplasmático no es suficiente para cumplir con las necesidades de la célula, activando la UPR (*Unfolded Protein Response*). El último bloque de la introducción explica con detalle estos fenómenos.

Algunos miembros de la terapia HAART activan estas rutas, sobre todo los PI. Esta activación lleva a una disrupción del metabolismo lipídico que podría estar mediada por una inhibición de la autofagia, necesaria para la correcta diferenciación de los adipocitos (McLean *et al.*, 2009; Zha *et al.*, 2013).

3.3. Los nuevos fármacos y la necesidad de seguir investigando

La mayor parte de los efectos adversos de la terapia HAART que se han descrito en este capítulo tienen que ver con los PI, los NRTI y los NNRTI. En los últimos años se han comenzado a utilizar nuevos fármacos de estas familias de nueva generación, cuyos efectos son menos agresivos sobre el tejido adiposo y el hígado. Sin embargo, puesto que la HALS y otras alteraciones del tejido adiposo pueden tardar varios años en aparecer, sigue siendo necesario investigar los efectos de estos fármacos, no sólo estudiando las biopsias de pacientes, sino también mediante estudios *in vitro* que puedan revelar posibles efectos perniciosos de estos fármacos.

Podemos poner el ejemplo de los nuevos inhibidores de la fusión, como el raltegravir. Este fármaco tiene efectos neutros sobre la adipogénesis *in vitro* (Pérez-matute *et al.*, 2011), sin embargo ya se han reportado casos de *Buffalo hump* en pacientes que siguen este tratamiento (Ferrer *et al.*, 2011). Esto nos indica que debemos seguir con este tipo de investigaciones para poder detectar posibles efectos adversos que puedan poner alerta a los médicos para que realicen un seguimiento más exhaustivo de los pacientes que reciben estas terapias nuevas y que no bajen la guardia.

Seguir investigando los efectos de los fármacos de la terapia HAART no sólo es importante para mejorar la vida de los pacientes de VIH-1, sino que también nos sirve como un modelo excelente para arrojar luz sobre la biología del tejido adiposo y poder aplicar esos conocimientos en la lucha contra otras enfermedades metabólicas como la obesidad, la gran epidemia del siglo XXI. Como dijimos antes, el estudio de las lipodistrofias, que comparten gran parte de las alteraciones metabólicas presentes en la obesidad, nos muestran como tanto

la falta como el exceso de tejido adiposo son dos caras de la misma moneda. Es el caso de la resistencia a la hormona FGF21, fenómeno que se da en ambas patologías y que me ha servido en mi tesis para comprender la importancia del correceptor β -klotho y la relación de este con fenómenos como el estrés de retículo.

BLOQUE IV – EL ESTRÉS DE RETÍCULO

1. EL MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS DE PROTEINAS

El retículo endoplasmático (ER) es un orgánulo celular encargado, entre otras funciones, de regular la síntesis, el plegamiento y la secreción de un alto porcentaje de las proteínas de las células eucariotas. Estas proteínas incluyen aquellas que forman parte del ER, del aparato de Golgi, de los lisosomas y de la membrana plasmática, así como aquellas que son secretadas por la célula para realizar funciones de comunicación intercelular o funciones autocrinas, paracrinas o endocrinas.

Un correcto funcionamiento de los sistemas de síntesis y plegamiento de proteínas es necesario para la homeostasis de las células. Es por eso que la selección natural ha dotado a las células eucariotas de un amplio abanico de sistemas para garantizar la homeostasis proteica, también conocida como proteostasis.

Cuando la homeostasis del ER se ve comprometida, se producirá una acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen de dicho orgánulo. Este fenómeno es conocido como estrés de retículo, que activará la *Unfolded protein response* (UPR), un conjunto de rutas celulares de estrés destinadas a solucionar el problema. Las rutas activadas por la UPR tratarán de paliar los efectos del estrés de ER induciendo la expresión de chaperonas, inhibiendo la síntesis de proteínas y activando la autofagia. Si el estrés se cronifica o es muy severo la UPR activará rutas proapoptóticas (Wang and Kaufman, 2012).

1.1. La *Unfolded Protein Response* (UPR)

La UPR ayuda a las células a adaptarse al estrés de retículo o a suicidarse cuando la adaptación no es viable. Esta respuesta comienza cuando se detectan niveles anormalmente altos de proteínas mal plegadas en el lumen del ER.

Existen tres rutas diferentes de activación de la UPR, cada una iniciada por una proteína transmembrana que conecta el lumen del retículo endoplasmático con el citoplasma. Estas proteínas son: la quinasa del retículo endoplasmático similar a PRKR (PERK), la proteína dependiente de inositol 1 α (IRE1 α) y el factor activador de la transcripción 6 (ATF6).

En condiciones normales, una chaperona, la proteína regulada por glucosa 78 (GRP78) (también conocida como BIP o HSPA5), se une a los dominios lumenales de estas tres proteínas transmembrana, secuestrándolas y manteniéndolas inactivas. Sin embargo, esta chaperona tiene una alta afinidad por las proteínas mal plegadas. Así, en situaciones de estrés de ER, las proteínas mal plegadas compiten por unirse a HSPA5, liberando a PERK, a IRE1 α y a ATF6 de su inactivación. Estas proteínas transmembrana se activarán y pondrán en marcha la UPR (Cnop, Foufelle and Velloso, 2012; Wang and Kaufman, 2016). (Figura 13)

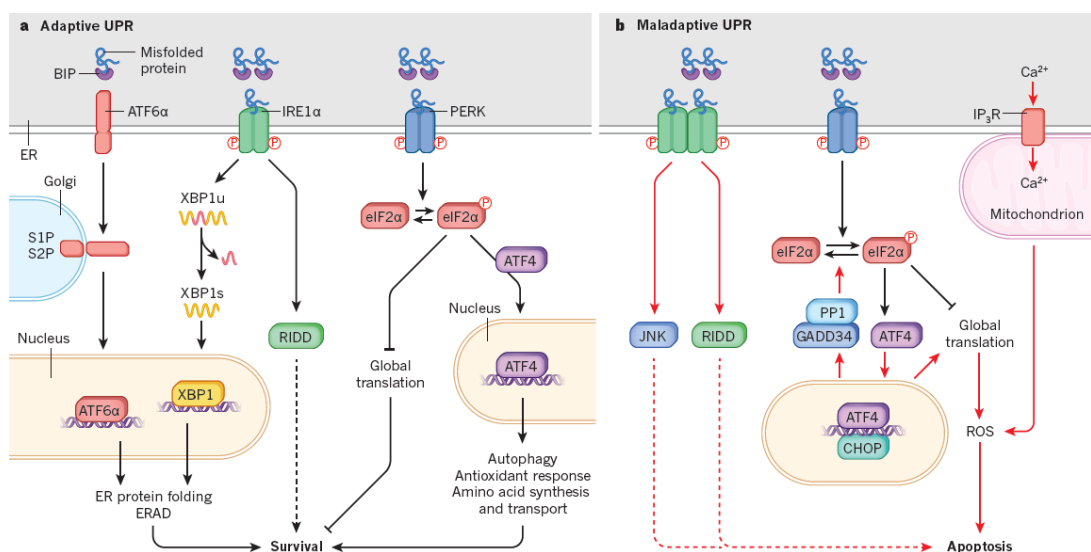


Figure 13. Esquema de las tres rutas de la UPR (a) y de la apoptosis mediada por CHOP10 inducida por la cronificación del ER. (Wang and Kaufman, 2016)

1.1.1. La ruta de PERK- eIF2 α

La acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del ER produce la activación de PERK, esta quinasa fosforila al factor de iniciación de la traducción eucariota 2 α (eIF2 α), inactivándolo y así inhibiendo la traducción de ARN

mensajero en nuevas proteínas. De esta forma la UPR inhibe la traducción, disminuyendo la cantidad de nuevas proteínas que el ER va a tener que procesar (Pakos-Zebrucka *et al.*, 2016).

Aunque la fosforilación de eIF2 α disminuye globalmente la síntesis de proteínas, también va a promover la traducción del ARNm del factor activador de la transcripción 4 (ATF4). Una vez sintetizada, la proteína ATF4 viaja al núcleo, donde promueve la transcripción de genes necesarios para la adaptación de la célula al estrés de ER, los cuales codifican proteínas relacionadas con la síntesis y el transporte de aminoácidos y con la respuesta al estrés oxidativo. Además, ATF4 activa la transcripción de la proteína homóloga de C/EBP (CHOP10), capaz de formar dímeros con ATF4 que se unen al ADN e inducen a expresión de otros genes de la UPR así como de genes relacionados con la autofagia (Harding *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2013).

Cuando se recupera la normalidad y el ER recupera su capacidad de plegar proteínas, ATF4 y CHOP10 promueven la expresión de la proteína GADD34, que desfosforila a eIF2 α para parar esta rama de la UPR (Harding *et al.*, 2009).

1.1.2. La ruta de IRE1 α -XBP1

Cuando IRE1 α se activa comienza a funcionar su actividad endorribonucleasa, que corta un fragmento de 26 nucleótidos de los transcritos de *XBP1*, generando la forma XBP1s, la cual, una vez traducida, es capaz de entrar en el núcleo y poner en marcha la transcripción de genes relacionados con la UPR. La mayoría de los genes regulados por esta ruta servirán para aumentar la capacidad de plegar y transportar proteínas, así como para degradar proteínas mal plegadas. Pero, además, esta ruta promueve una caída de los niveles de ARNm destinada a disminuir el pool de proteínas que el ER tiene que plegar (Hollien and Weissman, 2006).

1.1.3. La ruta de ATF6

Si se acumulan proteínas mal plegadas en el lumen del ER, la proteína ATF6 se separa de la membrana y viaja al aparato de Golgi, donde será procesada hasta formar un fragmento capaz de entrar en el núcleo y de promover la expresión de varias chaperonas, aumentando así la capacidad del ER para plegar proteínas. Entre estas chaperonas se encuentra HSPA5, la proteína que se encontraba dentro del lumen del ER unida a las tres proteínas transmembrana iniciadoras de las rutas de la UPR. La sobreexpresión de HSPA5 suele ser utilizada como marcador de estrés de retículo.

Cada vez existen más evidencias de que el estrés de ER no activa las tres ramas de la UPR simultáneamente. Las rutas de ATF6 e IRE1 α se activarían inmediatamente y se irían atenuando al poco tiempo. Sin embargo, PERK se activaría después y persistiría en el tiempo si el estrés de ER se cronifica (Rutkowski *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007).

1.2. Estrés de retículo y apoptosis

Cuando la UPR no consigue devolver la homeostasis proteica a la célula y la UPR queda activada de forma crónica, esta induce el suicidio de la célula a través de la ruta PERK eIF2 α – ATF4–CHOP, ya que la proteína CHOP10 es capaz de inducir la expresión de varias proteínas proapoptóticas (Rutkowski *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007).

CHOP10 además es capaz de inducir la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y llevar a la célula a un estado de estrés oxidativo capaz de matarla. El heterodímero formado por ATF4-CHOP10 hace que se recuperen los niveles de transcripción previos a la UPR, aumentando de nuevo los ARNm y, por tanto, llevando los niveles de síntesis de proteínas a unos niveles que la célula no puede asimilar y favoreciendo la formación de ROS (Harding *et al.*, 2009).

Además, CHOP10 activa la oxidasa del retículo endoplasmático 1 α (ERO1 α), una oxidorreductasa que participa en el plegamiento de proteínas, concretamente en la formación de puentes disulfuro, transfiriendo electrones desde estos puentes a moléculas de oxígeno, produciendo así peróxido de hidrógeno. Esta reacción produce por tanto la acumulación de (ROS) (Zinszner *et al.*, 1998; Marciniak *et al.*, 2004; Malhotra *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2008). Esta acumulación de ROS lleva a la liberación de Ca²⁺ desde el ER, que es captado por las mitocondrias, donde también induce la formación de ROS (Kaufman and Malhotra, 2014).

Podemos considerar que el estrés de ER induce la muerte celular a través de una acumulación de ROS y de una pérdida de funcionalidad de las mitocondrias mediada por CHOP10.

2. EL ESTRÉS DE RETÍCULO EN LAS PATOLOGÍAS METABÓLICAS

Patologías como la obesidad y las lipodistrofias llevan asociadas una serie de alteraciones metabólicas que, con los años, se han ido relacionando con el estrés de retículo.

Una de las complicaciones más comunes que encontramos tanto en las personas obesas como en las que siguen tratamientos con antiretrovirales (especialmente del tipo de los inhibidores de la proteasa vírica) es el desarrollo de resistencia a la insulina, considerado como el paso previo al desarrollo de diabetes tipo 2 (F Villarroya, Domingo and Giralt, 2007; Giralt, Domingo and Villarroya, 2011). Esta resistencia aparece principalmente en el hígado, en el tejido adiposo y en el músculo esquelético. Actualmente existen múltiples estudios que vinculan el desarrollo de resistencia a la insulina con fenómenos de estrés de ER.

2.1. Estrés de retículo y resistencia a la insulina en el hígado

El desarrollo de resistencia a la insulina en el hígado supone un grave problema debido a que el hígado es un punto de integración en la regulación del metabolismo. La insulina envía al hígado mensajes sobre el estado nutricional del organismo, los cuales no podrán ser percibidos cuando el hígado se vuelve resistente a los efectos de esta hormona. Es por eso que la resistencia a la insulina incrementa la gluconeogénesis y la lipogénesis, causando hiperglicemia e hiperlipidemia (Wang and Kaufman, 2012).

Existen varios mecanismos a través de los cuales el estrés de ER puede causar resistencia a la insulina en el hígado. Para empezar, la ruta de IRE1 α activa las vías de JNK e IKK, que impiden la señalización de la insulina fosforilando a las proteínas *insulin receptor substrate* (IRS) 1 y 2 (Wang and Kaufman, 2012). También cabe nombrar a TRIB3, una proteína quinasa sobreexpresada en el hígado durante el estrés de ER y que parece estar relacionada con el desarrollo de resistencia a la insulina mediante la inhibición de la señalización de la vía Akt/PKB (Du *et al.*, 2003). Además, se ha observado como el estrés de ER hepático es capaz de alterar la gluconeogénesis (Wang *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2011).

Se ha reportado como el estrés de ER induce la activación de la proteína de unión al elemento regulador del esterol 1 (SREBP1c), el principal regulador de la lipogénesis hepática. De esta forma el estrés de ER promueve la acumulación de lípidos en el hígado, contribuyendo al desarrollo de resistencia a la insulina en este órgano (Fu, Watkins and Hotamisligil, 2012; Wang *et al.*, 2012).

2.2. Estrés de retículo y resistencia a la insulina en el tejido adiposo

Tanto en humanos como en ratones se ha observado que la obesidad induce la activación de las vías de estrés de retículo en el tejido adiposo. Las altas

concentraciones de ácidos grasos libres (sobre todo saturados, como el palmitato), como las que se aparecen en individuos obesos, son capaces de inducir el estrés de retículo en los adipocitos (Cnop, Foufelle and Velloso, 2012; Flamment *et al.*, 2012).

La activación del estrés de ER en adipocitos altera la secreción de adipoquinas, incluyendo la leptina y la adiponectina e induce la secreción de citoquinas proinflamatorias, promoviendo la resistencia a la insulina. Además es capaz de inducir la lipólisis, lo que lleva al tejido adiposo a liberar grandes cantidades de ácidos grasos libres que pueden infiltrarse en otros tejidos, como el hígado o el músculo esquelético, contribuyendo que estos desarrollen estrés de retículo y resistencia a la insulina (Flamment *et al.*, 2012).

2.3. Estrés de retículo y resistencia a la insulina en el músculo esquelético

Los ácidos grasos libres, normalmente procedentes del tejido adiposo, que se infiltran en el músculo esquelético, pueden activar las rutas de estrés de retículo en los miocitos.

Algunos estudios indican que el estrés de retículo en el músculo esquelético causa resistencia a la insulina a través de la ruta de IRE1 α -JNK, que induciría la fosforilación de IRS 1 y 2. Aunque otros estudios indican que el desarrollo de resistencia a la insulina en este tejido requiere de la activación de mTORC1 (Flamment *et al.*, 2012).

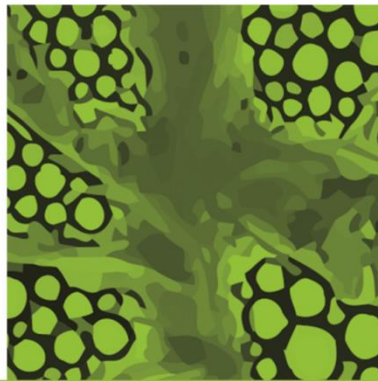
2.4. Estrés de retículo y sistema FGF21/ β -Klotho

En estudios recientes se ha observado como el estrés de retículo induce la expresión y producción de FGF21 en el hígado (Schaap *et al.*, 2013). Esta inducción se produce gracias a que la secuencia promotora del gen que codifica FGF21 posee dos secuencias de unión a ATF4, que inducen la expresión de *FGF21* tanto durante la activación de rutas de estrés de retículo como en

situaciones de ayuno, durante las cuales la falta de aminoácidos da la señal que induce esta respuesta (De Sousa-Coelho, Marrero and Haro, 2012). El papel de ATF4 indicaría que la expresión de *FGF21* es inducida a través de la ruta de PERK- eIF2 α , sin embargo, en otro estudio reciente se observó que la ruta IRE1 α -XBP1 también participa de esta inducción (Jiang *et al.*, 2014).

En éste y otros estudios también se observó que FGF21 no sólo es inducido por el estrés de retículo, sino que además tiene una función protectora, disminuyendo la acumulación de lípidos en el hígado tanto en ratones obesos como en modelos inyectados con fármacos inductores de estrés de retículo (Jiang *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015).

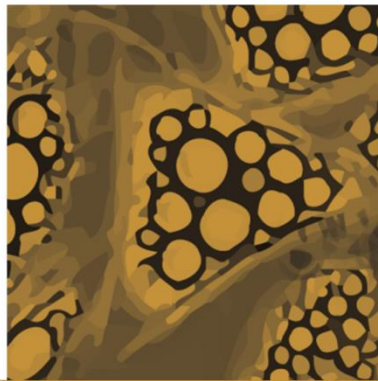
El estrés de retículo también actúa sobre β -klotho (KLB), el correceptor de FGF21, disminuyendo sus niveles en las células adiposas y disminuyendo la capacidad de estas de responder a los efectos de esta hormona (Díaz-Delfín, Hondares, *et al.*, 2012). Por eso se considera que el estrés de retículo podría estar relacionado con la aparición del estado de resistencia a FGF21 que aparece en personas obesas, con diabetes tipo II o con lipodistrofía (Gallego-Escuredo *et al.*, 2012, 2015)



2. Objetivos

Los pacientes infectados por VIH que siguen la terapia antirretroviral manifiestan importantes alteraciones metabólicas que implican al tejido adiposo, pudiendo incluso desarrollar lipodistrofia. En estos pacientes el recientemente identificado sistema hormonal FGF21 se encuentra alterado, aunque se desconoce cómo ello impacta en el metabolismo y la función adipocitaria. Con la finalidad de clarificar distintos aspectos de la patología adiposa en los pacientes y la implicación de las disfunciones relacionadas con FGF21, hemos abordado los siguientes objetivos:

- 1.** Caracterizar la firma molecular de los lipomas de tipo “giba de búfalo” en comparación con otros lipomas en pacientes VIH.
- 2.** Estudiar los posibles efectos adversos del nuevo fármaco antirretroviral elvitegravir sobre los adipocitos humanos.
- 3.** Caracterizar los efectos de las diferentes familias de fármacos de la terapia antirretroviral sobre el sistema FGF21/ β -Klotho en distintos tipos de células humanas.
- 4.** Analizar el efecto de la disminución de β -Klotho sobre el metabolismo, la adiposidad y la capacidad termogénica de los tejidos adiposos utilizando el modelo de ratón *knock-out* para el gen que codifica β -Klotho.
- 5.** Estudiar el papel de β -Klotho en la respuesta a estímulos adrenérgicos a nivel celular en adipocitos marrones y beige.
- 6.** Estudiar el papel de FGF21 en la inducción del programa termogénico como respuesta a un estímulo adrenérgico en adipocitos marrones y beige.



3. Informe de los directores

INFORME DELS CO-DIRECTORS EN RELACIÓ A LA TESI DOCTORAL DE RICARDO MOURE ORTEGA (PUBLICACIONS I PAPER DEL DOCTORAND):

En tant que codirectors de la Tesi Doctoral de Ricardo Moure, fem constar que els treballs corresponents a la memòria científica s'estructuren en base als següents articles científics:

1. Cereijo R, Gallego-Escuredo JM, **Moure R**, Villarroya J, Domingo JC, Fontdevila J, Martínez E, Gutiérrez Mdel M, Mateo MG, Giralt M, Domingo P, Villarroya F.

The Molecular Signature of HIV-1-Associated Lipomatosis Reveals Differential Involvement of Brown and Beige/Brite Adipocyte Cell Lineages.

PLoS One. 2015 Aug 25;10(8):e0136571.

IF: 3,05 MULTIDISCIPLINARY SCIENCES 11 DE 63 (1er Quartil),

En aquest treball, el doctorand realitzà els estudis d'expressió gènica en relació a marcadors de fenotip "brown/beige" en mostres de teixit adipós de pacients HIV, a més de participar en la el.laboració del conjunt del treball i la seva discussió.

2. **Moure R**, Domingo P, Gallego-Escuredo JM, Villarroya J, Gutierrez Mdel M, Mateo MG, Domingo JC, Giralt M, Villarroya F.

Impact of elvitegravir on human adipocytes: Alterations in differentiation, gene expression and release of adipokines and cytokines.

Antiviral Res. 2016 Aug;132:59-65

IF: 4,91 PHARMACOLOGY & PHARMACY 22 de 255 (1er Decil); VIROLOGY 4 DE 33 (1er Quartil).

3. **Moure R**, Gasa L, Domingo P, Villarroya J, Gutierrez M del M, Mateo MG, Domingo JC, Villarroya F, Giralt M,

Effects of antiretroviral drugs used in HIV infection on the FGF21/ β -Klotho system.

Antiviral Res. (Submitted)

IF: 4,91 PHARMACOLOGY & PHARMACY 22 de 255 (1er Decil); VIROLOGY 4 DE 33 (1er Quartil).

El doctorand, primer autor de les dues publicacions anteriors, ha tingut tot el protagonisme en l'obtenció experimental de les dades així com en l'evolució i progressió dels estudis, i ha participat de manera essencial en la discussió científica dels resultats. El paper dels altres coautors ha estat el donar suport a aspectes experimentals (suport als cultius cel.lulars i alguns aspectes analítics específics) així com la participació dels co-directors i altres autors sènior que han participat en aspectes intel.lectuals, d'elaboració i contextualització de les dades.

4. **Moure R**, Quesada-López T, Morón S, Cereijo R, Cairó M, Hernáez A, Giralt M, Villarroya F.

The levels of β -Klotho determine the thermogenic responsiveness of adipose tissues: involvement of the autocrine action of FGF21

Molecular Metabolism (Submitted)

IF: 5,36 ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM 17 DE 133 (1ER Quartil).

El doctorand és el primer autor del manuscrit anterior, enviat a publicar. El treball ha estat protagonitzat totalment pel doctorand, que ha desenvolupat el model experimental de ratolins KO per a β -Klotho, havent-se responsabilitat tant dels estudis in vivo com in vitro. Ha tingut un paper clau tant en la experimentació com en el disseny i interpretació dels resultats. El paper dels altres coautors ha estat el donar suport a aspectes experimentals relacionats amb la gestió i obtenció de mostres dels models animals, així com la participació dels co-directors i altres autors sènior implicats en aspectes intel·lectuals, d'elaboració i interpretació de les dades.

5. Quesada-López T, Cereijo R, Turatsinze JV, Planavila A, Cairó M, Gavalda-Navarro A, Peyrou M, **Moure R**, Iglesias R, Giralt M, Eizirik DL, Villarroya F

The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes.

Nat Commun. 2016 Nov 17;7:13479.

IF: 11,33. 3 de 63 MULTIDISCIPLINARY SCIENCES (1er Decil).

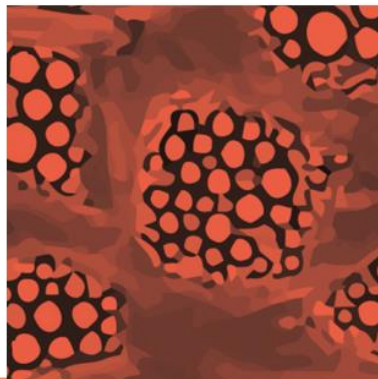
Juntament amb els articles anteriors, que formen el nucli temàtic essencial de la Tesi, durant el període de realització del seu doctorat R. Moure ha desenvolupat treballs relacionats que han resultat en una altra publicació. Fonamentalment R. Moure ha desenvolupat les tècniques de cultius primaris d'adipòcits beix i la seva diferenciació, així com altres procediments analítics que han estat bàsics per a la següent publicació en què consta com a coautor. La temàtica està estretament relacionada amb els estudis de regulació del teixit adipós marró i beix, per la qual cosa R. Moure ha contribuït també des del punt de vista d'anàlisi i interpretació global de les dades.

A Barcelona, el 12 de juny de 2017

Signat:

Marta Giralt Oms
(Directora)

Francesc Villarroya Gombau
(Co-director)



4. Publicaciones

The Molecular Signature of HIV-1-Associated Lipomatosis Reveals Differential Involvement of Brown and Beige/Brite Adipocyte Cell Lineages

Revista: PLoS One

PMID: 26305325

Título: *La firma molecular de la lipomatosis asociada al VIH-1 demuestra una implicación diferencial de los linajes adiposos marrón y beige/brite.*

Resumen: La terapia antirretroviral de alta actividad ha mejorado considerablemente la calidad de vida de los pacientes infectados por VIH-1. Sin embargo, este tratamiento ha sido vinculado con el desarrollo del llamado "síndrome lipodistrófico", que conlleva una serie de efectos metabólicos adversos y de alteraciones morfológicas. Entre éstas, las más habituales son el desarrollo de fenómenos de lipoatrofia en los depósitos subcutáneos de ciertas áreas anatómicas y la hipertrofia de los depósitos viscerales. Con menor frecuencia, también aparecen proliferaciones lipomatosas de tejido adiposo subcutáneo en diferentes regiones anatómicas. El tejido adiposo lipomatoso de la región dorsocervical (conocido como "giba de búfalo") ha sido asociado con un fenotipo intermedio entre el blanco y el marrón y con un incremento en la proliferación celular. Para caracterizar los principales eventos moleculares asociados a la aparición de la lipomatosis en los pacientes con VIH-1, hemos analizado biopsias de tejido adiposo procedente de lipomas de tipo "giba de búfalo", de lipomas procedentes de otras localizaciones anatómicas, y de tejido adiposo subcutáneo de individuos sanos. Después hemos comparado la firmas moleculares de los tres grupos. Tanto las "gibas de búfalo" como los lipomas que no lo eran mostraron patrones similares de expresión en los marcadores de adipogénesis, así como un perfil inflamatorio no alterado, un estado libre de

fibrosis y una elevada actividad proliferativa. La disminución en la longitud de los telómeros, la acumulación de prelamina A y la inducción de la SA- β -Gal, indicadores de fenómenos de senescencia y de envejecimiento, también fueron fenómenos comunes a ambos tipos de tejidos lipomatosos. Las biopsias de "giba de búfalo" mostraban la expresión de ciertos genes marcadores de tejido adiposo marrón (como UCP1) y, más específicamente, de adipocitos marrones clásicos (por ejemplo, ZIC1), pero no de los de adipocitos beige / brite. Estos patrones de expresión génica relacionados con la grasa marrón no aparecían en los tejidos lipomatosos procedentes de otras ubicaciones anatómicas. En conclusión, las "gibas de búfalo" y el resto de estructuras neoplásicas de tejido adiposo subcutáneo de los pacientes infectados por VIH-1 comparten un carácter lipomatoso similar. Sin embargo, en el caso de los lipomas de la región dorsocervical, se observa una inducción aberrante del fenotipo blanco y marrón clásico que no aparece en el resto de lipomas. Esto nos indica que los insultos causados por la infección por el VIH-1 y/o por la terapia antirretroviral que conducen a la aparición de lipomas actúan diferencialmente en función de la ubicación y del linaje celular.

RESEARCH ARTICLE

The Molecular Signature of HIV-1-Associated Lipomatosis Reveals Differential Involvement of Brown and Beige/Brite Adipocyte Cell Lineages

Rubén Cereijo¹, José Miguel Gallego-Escuredo¹, Ricardo Moure¹, Joan Villarroya^{1,2}, Joan Carles Domingo¹, Joan Fontdevila³, Esteban Martínez⁴, Maria del Mar Gutiérrez², María Gracia Mateo², Marta Giral¹, Pere Domingo², Francesc Villarroya^{1*}

1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biomedicine of the University of Barcelona, and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Barcelona, Catalonia, Spain, **2** Infectious Disease Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain, and Red de Investigación en SIDA, Instituto de Salud Carlos III, Spain, **3** Department of Plastic Surgery, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain, **4** Infectious Diseases Unit, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Hospital Clínic de Barcelona (HCB), Barcelona, Spain

* fvillarroya@ub.edu



OPEN ACCESS

Citation: Cereijo R, Gallego-Escuredo JM, Moure R, Villarroya J, Domingo JC, Fontdevila J, et al. (2015) The Molecular Signature of HIV-1-Associated Lipomatosis Reveals Differential Involvement of Brown and Beige/Brite Adipocyte Cell Lineages. PLoS ONE 10(8): e0136571. doi:10.1371/journal.pone.0136571

Editor: Juergen Eckel, GDC, GERMANY

Received: March 9, 2015

Accepted: August 4, 2015

Published: August 25, 2015

Copyright: © 2015 Cereijo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was funded by projects PI11/02512, PI11/00376, PI14/00700 and PI14/00063 from the Instituto de Salud Carlos III (<http://www.isciii.es/>) and by project SAF2011/23636 from the Ministerio de Economía y Competitividad (<http://www.mineco.gob.es/portal/site/mineco>) of the Spanish Government. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Highly active antiretroviral therapy has remarkably improved quality of life of HIV-1-infected patients. However, this treatment has been associated with the so-called lipodystrophic syndrome, which conveys a number of adverse metabolic effects and morphological alterations. Among them, lipoatrophy of subcutaneous fat in certain anatomical areas and hypertrophy of visceral depots are the most common. Less frequently, lipomatous enlargements of subcutaneous fat at distinct anatomic areas occur. Lipomatous adipose tissue in the dorso-cervical area (“buffalo hump”) has been associated with a partial white-to-brown phenotype transition and with increased cell proliferation, but, to date, lipomatous enlargements arising in other parts of the body have not been characterized. In order to establish the main molecular events associated with the appearance of lipomatosis in HIV-1 patients, we analyzed biopsies of lipomatous tissue from “buffalo hump” and from other anatomical areas in patients, in comparison with healthy subcutaneous adipose tissue, using a marker gene expression approach. Both buffalo-hump and non-buffalo-hump lipomatous adipose tissues exhibited similar patterns of non-compromised adipogenesis, unaltered inflammation, non-fibrotic phenotype and proliferative activity. Shorter telomere length, prelamin A accumulation and SA-β-Gal induction, reminiscent of adipocyte senescence, were also common to both types of lipomatous tissues. Buffalo hump biopsies showed expression of marker genes of brown adipose tissue (e.g. UCP1) and, specifically, of “classical” brown adipocytes (e.g. ZIC1) but not of beige/brite adipocytes. No such brown fat-related gene expression occurred in lipomatous tissues at other anatomical sites. In conclusion, buffalo hump and other subcutaneous adipose tissue enlargements from HIV-1-infected patients share a similar lipomatous character. However, a distorted induction of white-to-“classical brown adipocyte” phenotype appears unique of dorso-cervical lipomatosis. Thus, the insults caused by

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

HIV-1 viral infection and/or antiretroviral therapy leading to lipomatosis are acting in a location- and adipocyte lineage-dependent manner.

Introduction

HIV-1 infection is currently treated using highly active anti-retroviral therapy (HAART), which has dramatically improved patients' life expectancy and quality. However, long-term HAART in HIV-1 patients is associated with a number of adverse effects, including a form of lipodystrophy designated HAART-associated lipodystrophy syndrome (HALS). Although removal of the most toxic components of HAART cocktails has decreased the incidence of HALS in recent years, the syndrome remains a frequent concern.

Altered adipose tissue distribution is a hallmark of HALS, with patients often showing lipodystrophy of subcutaneous adipose tissue in the face, arms, legs and buttocks; however, hypertrophy of visceral adipose tissue similar to abdominal obesity is also common [1,2]. Less frequently, lipomatous alterations take place in HAART-treated patients, the most common of which is a dorso-cervical accumulation, commonly referred to as "buffalo hump" (BH) [3]. Another site of prevalent lipomatous adipose enlargement is the pubic area [4], and a pattern of accumulation of fat leading to circumferential enlargement of the neck, also called "bullfrog neck", has also been reported [5]. In addition, multiple reports have indicated the presence of lipomas in HIV-1-treated patients scattered at different anatomical areas, such as the neck, trunk, and limbs [4,6].

To date, molecular characterization of lipomatous tissue in HIV-1-infected patients has been limited to the dorso-cervical BH fat. These studies have revealed a decrease in mitochondrial DNA (mtDNA) abundance in BH. However, this alteration is not likely to account for the hypertrophic response of the dorso-cervical fat because other subcutaneous areas, which exhibit the opposite lipodystrophic behavior, show similar levels of mtDNA depletion. Adipogenesis and inflammation, however, are not altered in BH; this is in contrast to the decreased expression of adipogenesis marker genes and induction of pro-inflammatory genes in lipodystrophic areas of the same patients [7]. Several studies have shown that adipose tissues in BH biopsies express uncoupling protein-1 (UCP1) [8,9] or 5'-deiodinase [10]—markers of brown adipose tissue (BAT)—especially in samples obtained from substantially enlarged lipomatous tissue requiring surgery.

With the recent use of positron emission tomography (PET) has come the recognition that BAT in adult humans is present mainly in the cervical-supraclavicular region [11–14]. However, lipomatous BH appears not to be composed of fully functional brown adipocytes, and a pathologically distorted adipocyte differentiation process that results in incomplete transition from the white to brown adipocyte phenotype has been suggested. Among the observed changes in BH cells, the acquisition of a highly proliferative status confirms the lipomatous features of fat accumulation in BH [7,15].

Recent years have seen important advancements in our understanding of brown adipocyte cell biology. Some brown adipocyte cells, now termed "classical" brown adipocytes, appear to derive from precursor cells common to skeletal muscle, whereas other brown adipocytes, referred to as beige or brite, appear to be more common to the white adipocyte cell lineage and, in fact, may be interspersed in white adipose tissue depots [16,17]. Whereas all types of brown adipocytes express *UCP1*, *PPARGC1A* (also known as *PGC-1α*) and *PRDM16* (PR domain-containing 16) genes, common markers of differentiation and thermogenic function, the

expression levels of specific marker genes, such as *ZIC1* (zinc finger protein of the cerebellum 1) for classical brown adipocytes allow the distinction of both types of brown adipocytes [18]. Human brown fat in adults (i.e., that present mainly in the cervical and sub-scapular region) was initially considered to be composed mainly of beige/brite cells. However, recent data suggests that there are also classical brown adipocyte-enriched areas in adult human thermogenic adipose tissue [17,19–21].

Although lipoatrophic adipose tissue in HIV-1-associated lipodystrophy has been thoroughly studied [22–24], why some patients develop such opposing, hypertrophic events also in the subcutaneous area remains a mystery, and no clear-cut indicators of specific antiretroviral patterns or other mechanistic determinants have been identified. Moreover, it is unknown whether the brown fat-like phenotype appears only in BH (i.e., at anatomical areas close to those where brown fat is prevalent in adult humans) or is a general phenomenon of HIV-1-associated lipomatosis everywhere in the body.

In the present study, we sought to identify the main molecular events associated with the hypertrophic distortions that occur in adipose tissue in HIV-1 patients. To this end, we systematically characterized the molecular signature of lipomatosis in these patients by analyzing lipomatous samples at distinct anatomical regions.

Materials and Methods

Patients

HIV-1-infected patients were eligible if they had either lipomatous dorso-cervical enlargement (BH) or lipomas from different anatomical locations (non-BH) that required surgical removal. Subjects who were hospitalized or had a frank cognitive impairment on enrollment were not eligible. Patients with opportunistic infections, acute hepatitis, liver insufficiency, neoplasms or fever of undetermined origin were also excluded from the study. At the time of study enrollment no patients were using any other drugs known to influence glucose metabolism or fat distribution, such as anabolic hormones or systemic corticosteroids, recombinant human growth hormone, or appetite stimulants. Informed consent was obtained from the patients upon enrollment. Biopsies of BH adipose tissue from 10 patients were analyzed upon surgical extraction. These samples were compared to non-BH lipomas removed from different anatomical locations (two pubic, two sub-maxillary, one arm, three abdominal) in eight HIV-1-infected, HAART-treated patients, as well as samples from 10 age-matched, healthy controls obtained on occasion of minor dermatological surgical procedures from subcutaneous adipose tissue at anatomical sites comparable to those in lipomatous samples, i.e., abdominal and upper (dorsal and double chin) areas. To be eligible, controls did not have to meet any of the exclusion criteria used for patients.

Demographic values, anti-retroviral treatment data and circulating parameters are shown in [Table 1](#). Age and body mass index (BMI) in patients and healthy controls were similar. Both patient groups had higher levels of serum triglycerides and cholesterol than controls. There were not significant differences in the cumulative time of treatment with the distinct types of anti-retroviral drugs (nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors, NRTIs; non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTIs; protease inhibitors, PIs) between the two patient groups.

Tissue processing, RNA and DNA extraction

All extractions were performed with the written informed consent of patients, and were approved by the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau ethics committee. Once extracted, adipose tissue biopsies were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. For RNA

Table 1. Demographic values, treatment data and biochemical parameters in controls and HIV-1-infected patients bearing BH and NBL lipomas.

	Control (n = 10)	HIV-1-infected patients	
		Buffalo hump (n = 10)	Non-buffalo hump lipomas (n = 8)
Age (years)	57.4 ± 3.6	55.8 ± 1.4	54.2 ± 2.0
Sex (n)	6	7	5
BMI (kg·m ⁻²)	26.1 ± 1.2	25.6 ± 2.6	25.3 ± 1.6
Glucose (mmol·L ⁻¹)	3.2 ± 0.3	3.7 ± 0.1	4.5 ± 0.8
Triglycerides (mmol·L ⁻¹)	1.2 ± 0.3	3.9 ± 0.5*	3.1 ± 0.6*
Cholesterol (mmol·L ⁻¹)	3.1 ± 0.6	5.6 ± 0.1*	6.2 ± 0.4*
Clinical lipodystrophy	No	Yes	Yes
Time since HIV-1 infection (months)	-	167 ± 18	177 ± 24
Cumulative time (months) on:			
NRTIs	-	140 ± 22	152 ± 20
NNRTIs	-	25 ± 2	32 ± 9
PIs	-	30 ± 12	38 ± 16
CD4+ lymphocytes (cells·μL ⁻¹)	-	549 ± 74	445 ± 84

Values are expressed as means ± SEM. Statistical differences between controls and both groups of lipodystrophic patients are shown as * whenever significant (p<0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0136571.t001

transcript analysis, frozen samples were fragmented by mechanical disruption and then homogenized in RA-1 buffer (Macherey-Nagel, Düren, Germany) supplemented with 10% β-mercaptoethanol. RNA was immediately isolated from the homogenate using a column affinity-based methodology (NucleoSpin[®] RNA II; Macherey-Nagel). DNA was separated from the tissue homogenate as a part of the protocol used for RNA extraction, dissolved in 70% ethanol, and purified by phenol/chloroform extraction.

Gene expression analysis

cDNA was synthesized from 0.5 μg of total RNA using MultiScribe reverse transcriptase and random hexamer primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). mRNA expression levels were determined by quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) using TaqMan reagents and an Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Real-time PCR was performed in a final volume of 20 μL using TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG reagent, and the following specific primer probes (TaqMan Gene Expression Assays; Applied Biosystems) as detailed in [S1 Table](#). Cytochrome *c* oxidase subunit II (*MT-CO2*) mRNA was quantified using custom-designed primers (forward, 5'-CAA ACC ACT TTC ACC GCT ACA C-3'; reverse, 5'-GAC GAT GGG CAT GAA ACT GT-3') and FAM-labeled probe (5'-AAA TCT GTG GAG CAA ACC-3') obtained from Applied Biosystems (Custom TaqMan Gene Expression Assays). mRNA levels of the genes of interest, normalized to that of the reference control (18S ribosomal RNA), were calculated using the comparative 2^{-ΔΔC_T} method.

Protein expression analysis

For Western blot analysis of protein expression, fragments of previously disrupted adipose tissue were homogenized in cold buffer consisting of 10 mmol·L⁻¹ HEPES (pH 7.5), 5 mmol·L⁻¹ ethylenediamine tetraacetic acid, 5 mmol·L⁻¹ dithiothreitol, and 5 mmol·L⁻¹ MgCl₂ supplemented with protease inhibitor (Complete-mini; Roche, Sant Cugat del Vallés, Spain). The

protein concentration in each sample was determined by the Bradford method, with detection of absorbance at 595 nm absorbance using a Shimadzu UV 160-A spectrophotometer. Homogenates containing equal amounts of protein (40 µg) were brought to a total volume of 35 µL with bidistilled water, mixed with 1/5 volume loading buffer (10% sodium dodecyl sulfate [SDS], 10% β-mercaptoethanol, 0.5 M Tris pH 6.8, 50% glycerol, 0.5% bromophenol blue) and incubated at 95°C for 5 min. Proteins in samples were then resolved on SDS-containing 10%–12% polyacrylamide gels and transferred to Immobilon-P nitrocellulose membranes (Millipore, Billerica, MA, USA) using a Mini Trans-Blot kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Blots were incubated with primary antibodies against PPARγ (sc-1984X), LPL (sc-73646), GLUT4 (sc-7938), PCNA (sc-25280), adiponectin (sc-26497) and lamin A/lamin C/prelamin A (sc-6215), obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); β2-microglobulin (P0163), obtained from Dako Cytomation (Glostrup, Denmark); cytochrome c oxidase subunit II (12C4), obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA); p53 (2570S) from Cell Signaling (Danvers, MA, USA) or β-actin (A5441), obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). After incubating with primary antibodies, blots were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG (BioRad), donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) or rabbit anti-goat IgG (Sigma), as appropriate. Immunoreactive proteins were detected using a Millipore Immobilon Western chemiluminescent HRP system (Millipore) and a Fujifilm ImageRecorder LAS-3000 detection device (Fujifilm, Tokyo, Japan). The optical density of each band was quantified using the MultiGauge 3.0 software suite (Fujifilm).

mtDNA quantification

Total DNA isolated from tissue samples was purified by phenol/chloroform extraction, as indicated above, and the relative abundance of mtDNA was assessed by real-time PCR as previously described [7]. mtDNA levels were expressed as the amount of the mitochondrial gene *MT-CYB* (cytochrome B) relative to the nuclear, intronless, single-copy gene *CEBPA* (CCAAT/enhancer binding protein alpha). The TaqMan probes used to determine *MT-CYB* and *CEBPA* expression are shown in [S1 Table](#).

Telomere relative length quantification

Telomere length was assessed by real-time PCR essentially as described previously [25]. Briefly, PCR was performed using 35 ng of total DNA (PCR template) isolated from tissue homogenates in a reaction containing 10 µL of 2x SYBR Green Master Mix reagent (Applied Biosystems) and 100 nM of specific primers (Sigma) for telomere repeats (Tel) or the single-copy housekeeping gene *36B4* (acidic ribosomal phosphoprotein P0) in a final volume of 20 µL. The following primer pairs were used: Tel, 5'-CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT-3' (forward) and 5'-GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT-3' (reverse); and *36B4*, 5'-GCA AGT GGG AAG GTG TAA TCC-3' (forward) and 5'-ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A-3' (reverse). C_T values were obtained for both Tel and *36B4* in each sample. Relative telomere abundance was quantified as the Tel/*36B4* ratio using the comparative $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method.

Statistical analysis

Results are expressed as means ± SEM. Statistical comparisons between groups were performed using a non-parametric analysis (Mann-Whitney U test). Statistical differences were considered significant for p-values < 0.05.

Results

The levels of transcripts for marker genes related to adipogenesis and adipose function (PPAR- γ , LPL and AdipoQ), inflammation (TNF α), macrophage infiltration (CD68), mitochondrial toxicity (MT-CO2), and fibrosis (COL1A2) were determined in lipomatous and healthy control adipose tissues (Fig 1). Lipomatous adipose tissue data were analyzed separately for BH samples and non-BH lipomatous tissue (NBL), as described in Materials and Methods.

Transcript levels for adipogenesis marker genes, including peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ , the master regulator of adipose differentiation, LPL (lipoprotein lipase), the enzyme responsible for fatty acid uptake and fat accretion in adipose tissue, and adiponectin, a main adipokine, were unaltered in BH compared with healthy subcutaneous adipose tissue. However, each of these three gene transcripts was systematically up-regulated in NBL from HIV-1-infected patients. Tumor necrosis factor (TNF)- α , a marker of inflammation, and CD68, a macrophage infiltration marker, were not altered in any of the adipose tissue sample groups analyzed. Expression of the mtDNA-encoded transcript *MT-CO2* was altered only in NBL samples, where it was significantly increased. Expression of the fibrosis marker *COL1A2* (collagen type I alpha 2) trended lower in BH and NBL samples relative to controls, but only the reduction in BH reached statistical significance.

Given that mitochondrial toxicity, specifically mtDNA depletion, is a relevant feature of co-morbidities present in HIV-1-infected patients undergoing treatment, we next quantified mtDNA levels. These analyses revealed that mtDNA levels were significantly reduced in BH samples relative to healthy controls, but were unaltered in NBL (Fig 1B).

We next extended our study to an analysis of marker expression at the protein level (Fig 2A and 2B). Unlike transcripts, protein levels of PPAR γ , LPL and adiponectin as well as those of the glucose transporter GLUT4, another protein associated with adipogenesis, were not significantly different between BH or NBL samples and controls. The abundance of β_2 -microglobulin, an indicator of inflammation, was also unaltered. Levels of the mtDNA-encoded protein MT-CO2 were significantly reduced relative to controls to a similar extent in both BH and NBL samples. An analysis of the expression of the proliferation marker, PCNA [26], showed a substantial increase in PCNA protein levels in BH and NBL relative to healthy subcutaneous adipose tissue, with the extent of the increase being similar for the two types of lipomatous tissue.

Considering the differences found, and taking into account the distinct anatomical location of NBL samples, we analyzed the gene expression and protein data by separately pooling data from samples taken from upper and lower body areas (using the waist as the dividing line). As shown in S2 Table, the only significant anatomical site-dependent changes observed were minor differences for *MT-CO2* and adiponectin expression in both NBL patients and healthy controls.

Accelerated ageing is often considered to be associated with co-morbidities that appear in HIV-1 patients, and telomere length in adipose tissue has been proposed as a marker of senescence and ageing-related phenomena that occur in fat under pathological conditions such as obesity [27]. We found that telomere length was profoundly decreased in both BH and NBL relative to healthy controls, with no differences between the two types of lipomatous tissue (Fig 3A). Notably, telomere length in lipoatrophic, non-lipomatous, adipose tissue from HIV-1-infected patients was not altered compared with that in healthy controls (data not shown). Determination of the expression of the *GLB1* gene, encoding SA- β -Gal [28], a marker of senescence, indicated a significant increase in both BH and NBL relative to controls (Fig 3B). We also measured p53 levels as a further marker of senescence but, in this case, no significant differences were found (data not shown).

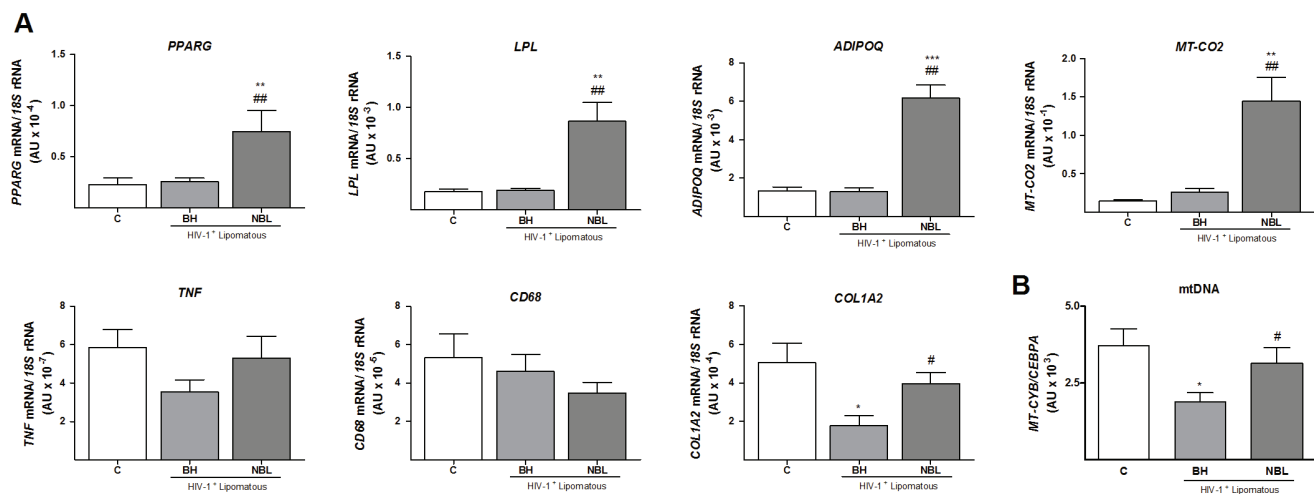


Fig 1. Expression of mRNA for various marker genes and mtDNA levels in BH and non-BH lipomas from HIV-1-infected, HAART-treated patients and healthy control subcutaneous adipose tissue. A) Relative mRNA levels of the indicated markers of adipogenesis and adipocyte function, mitochondrial function, inflammation, and fibrosis were determined by qRT-PCR. Means \pm SEM, expressed as ratios relative to 18S rRNA, are shown for each target mRNA. B) mtDNA data are presented as means \pm SEM, expressed as a ratio units between the mitochondrial gene *MT CYB* and the single-copy nuclear gene *CEBPA* levels (* p <0.05, lipomas vs. healthy control; # p <0.05, NBL vs. BH). (* p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001, lipoma vs. healthy subcutaneous adipose tissue; # p <0.05, ## p <0.01, NBL vs BH). Means correspond to 10 (C, BH) and 8 (NBL) samples.

doi:10.1371/journal.pone.0136571.g001

Several partial lipodystrophy syndromes of genetic origin, sometimes associated with local lipomatous phenomena, are caused by alterations in the synthesis of lamin A protein that results in accumulation of the unprocessed prelamina A form in lipomatous tissue [29]. This phenomenon has been related to accelerated ageing [30]. We detected this high-molecular-weight, unprocessed form of prelamina A in BH and NBL samples, but found only weak expression in control adipose tissue, thus the prelamina A/lamin A ratio was increased in both BH and NBL relative to healthy control adipose tissue. (Fig 3C).

Finally, we analyzed the expression of brown-versus-white adipose tissue marker genes (Fig 4A). Expression of *UCP1* and *PPARGC1A* mRNA was significantly higher in BH, but not NBL, compared with healthy control adipose tissue, whereas *PRDM16* transcript levels were unchanged. Expression of the β_3 -adrenergic receptor, on the other hand, was dramatically repressed in BH, but not in NBL. We further analyzed the expression of marker genes recently proposed to distinguish between classical or developmentally programmed brown adipose tissue and inducible or beige/brite brown adipose tissue [31,32] (Fig 4B–4D). *ZIC1* mRNA, which was highly expressed in BH, showed negligible and very low expression in control adipose tissue and NBL, respectively. In contrast, *EBF3* (early B-cell factor 3) and *FBXO31* (F-box only protein 31), two other marker genes proposed to distinguish between the two types of brown fat, were upregulated in common in BH and NBL compared with controls. An analysis genes proposed in some studies to be markers of the beige/brite type of fat showed that expression of *TBX1* (T-box 1) was decreased in both enlarged BH and NBL sites compared with control fat, whereas *TMEM26* and *TNFRSF9/CD137* (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9) expression were not different among adipose tissues. It has been proposed that expression of *HOXC8* (homeobox C8) and *HOXC9* (homeobox C9) genes is preferentially associated with the white adipocyte phenotype relative to either the classical or beige/brite brown phenotype. We found that *HOXC9* expression was dramatically reduced in BH but unaltered in NBL relative to controls, whereas *HOXC8* was significantly increased in NBL.

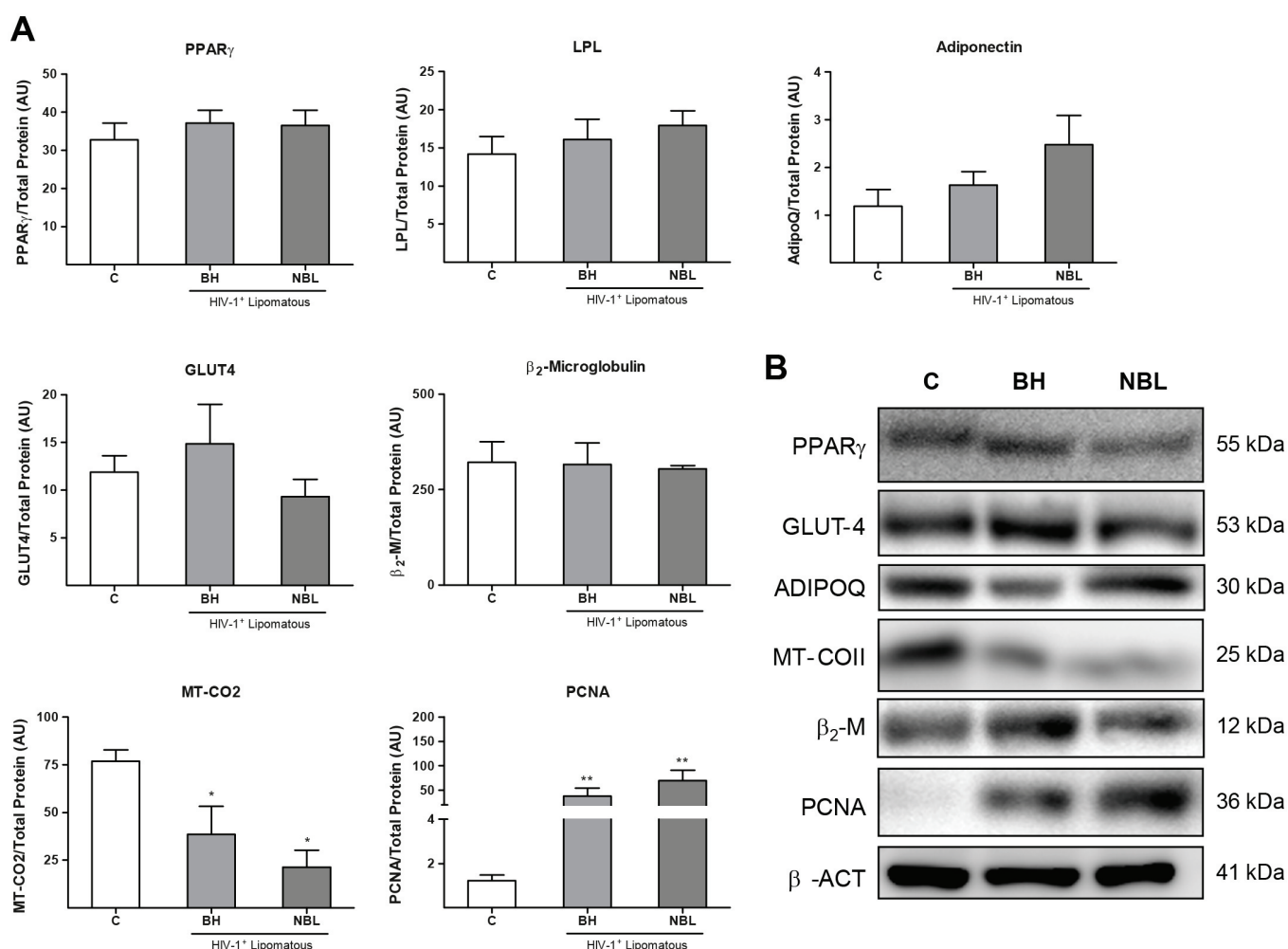


Fig 2. Expression of protein for various marker genes in BH and non-BH lipomas from HIV-1-infected, HAART-treated patients and healthy control subcutaneous adipose tissue. **A)** Relative protein levels of the indicated markers of adipogenesis and adipocyte function, mitochondrial function, inflammation, and cell proliferation were determined by densitometric analysis of Western blots. Means \pm SEM of 10 (C, BH) and 8 (NBL) samples expressed as ratios of the optical density of each band corrected for total protein level, are shown for each protein (* p <0.05, ** p <0.01 and, lipomas vs. healthy subcutaneous adipose tissue; # p <0.05, ## p <0.01 and ### p <0.001, NBL vs. BH). **B)** Representative Western blot bands for selected genes of each functional group in panel A for controls (C), BH, and NBL. Each sample corresponds to an individual from each group. β -actin was used as a loading control. The molecular weight of each specific immunoreactive signal is shown at right. ADIPOQ, adiponectin; MT_COII, mitochondrial DNA-encoded subunit II of cytochrome c oxidase.

doi:10.1371/journal.pone.0136571.g002

Discussion

Dorso-cervical adipose accumulation, often referred as buffalo hump, is an alteration that occurs with a certain frequency in HIV-1 patients undergoing antiretroviral treatment, but attempts to associate it with specific patterns of treatment or other variables have been unsuccessful. There have been recent reports of the appearance of BH even in patients undergoing newer drug treatment regimens (e.g., raltegravir-based) with low toxicity towards adipose function and metabolism [33]. In addition to BH, adipose enlargements randomly occur in patients at other sites of subcutaneous adipose tissue, with the highest frequency observed in the neck [5] and pubic [4] regions. Previous studies have shown that expression of adipogenesis and inflammation marker genes is unaltered in BH in HIV-1-infected, HAART-treated patients;

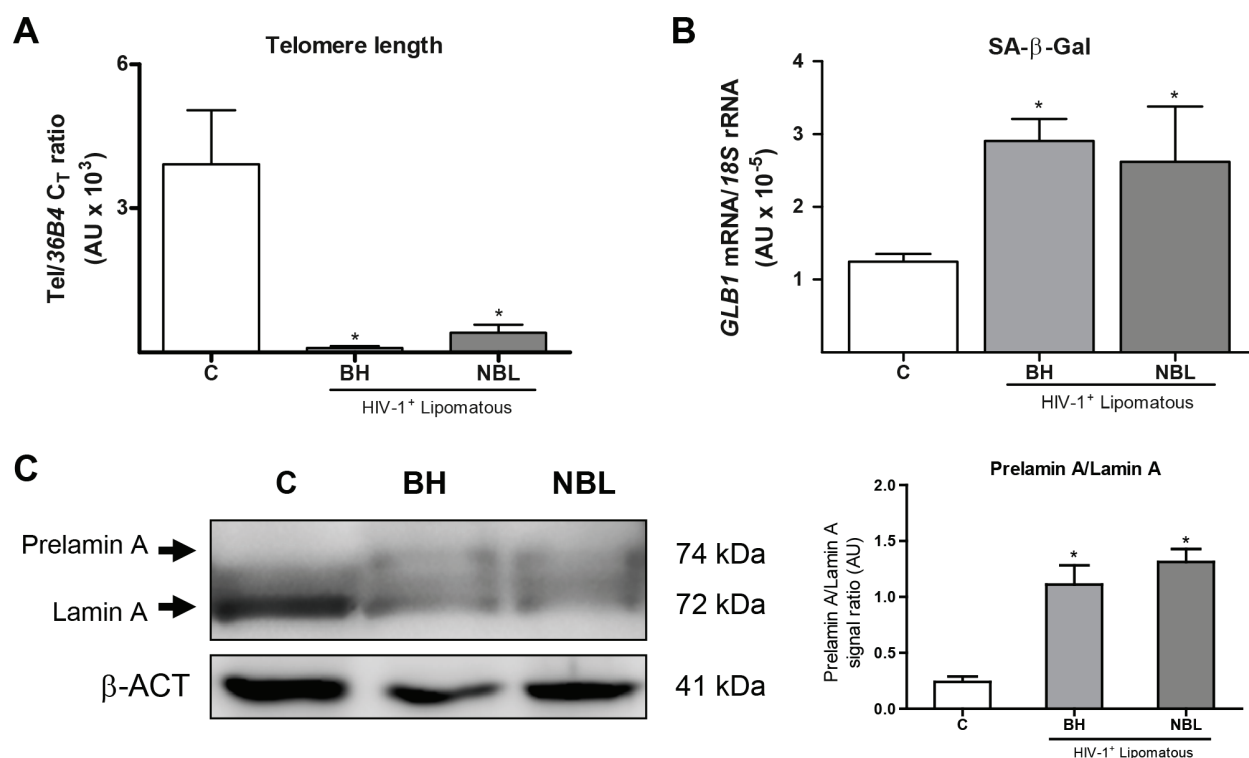


Fig 3. Relative telomere length, expression of *GLB1* (SA-β galactosidase) and prelamins A/lamin A ratio in adipose tissue from BH and NBL lipomas from HIV-1—infected, HAART-treated individuals and in subcutaneous adipose tissue from healthy controls. **A)** Relative telomere lengths are presented as means ± SEM, expressed as a ratio of arbitrary fluorescence units for telomere repeats (Tel) to the single-copy nuclear gene 36B4 (*p<0.05, lipomas vs. healthy controls). **B)** Relative mRNA levels of SA-β-Galactosidase. Means ± SEM, expressed as ratios relative to 18S rRNA, are shown. **C)** Prelamin A/lamin A ratio are presented as means ± SEM of the relative densitometric analysis of western blots (right), representative western blot bands for lamin A and prelamins A are shown (left). The bands for both processed lamin and unprocessed prelamins are indicated with arrows. Means correspond to 10 (C, BH) and 8 (NBL) samples.

doi:10.1371/journal.pone.0136571.g003

this contrasts with the repressed adipogenesis and enhanced local inflammation observed in lipoatrophic subcutaneous fat [7]. We found that non-BH enlarged adipose depots apart from BH presented similar patterns of unaltered adipogenesis and inflammation, at least at the protein level. This finding confirms that hypertrophy of subcutaneous fat is associated with protection from the induction of pro-inflammatory responses that are known to take place at sites prone to lipoatrophy in HIV-1 patients. A feature of NBL that distinguishes it from BH is that protein markers of adipogenesis (LPL, PPARγ, adiponectin) are unchanged despite enhanced expression of the corresponding transcripts. The mechanisms underlying this discordance are unknown, but the fact that post-transcriptional and post-translational mechanisms are known to be relevant for determining LPL and PPAR-γ protein levels in adipose tissues should be taken into account [34,35]. Discordances between changes in adiponectin transcript and protein levels occur in subcutaneous adipose tissue from HIV-1-infected patients [36,37]. Moreover, as a secreted protein, adiponectin steady-state levels in cells may not change despite concerted alterations in synthesis and output, a fact that may also help explain this observation.

Indeed, our current findings support the lipomatous character of these other subcutaneous adipose tissue enlargements that appear locally in HIV-1 patients (i.e., pubic area, circumferential neck), as previously reported for BH [7]. The increased expression of PCNA, a bona fide marker of cell proliferation, confirms the activated cell-cycle status in the distinct, enlarged

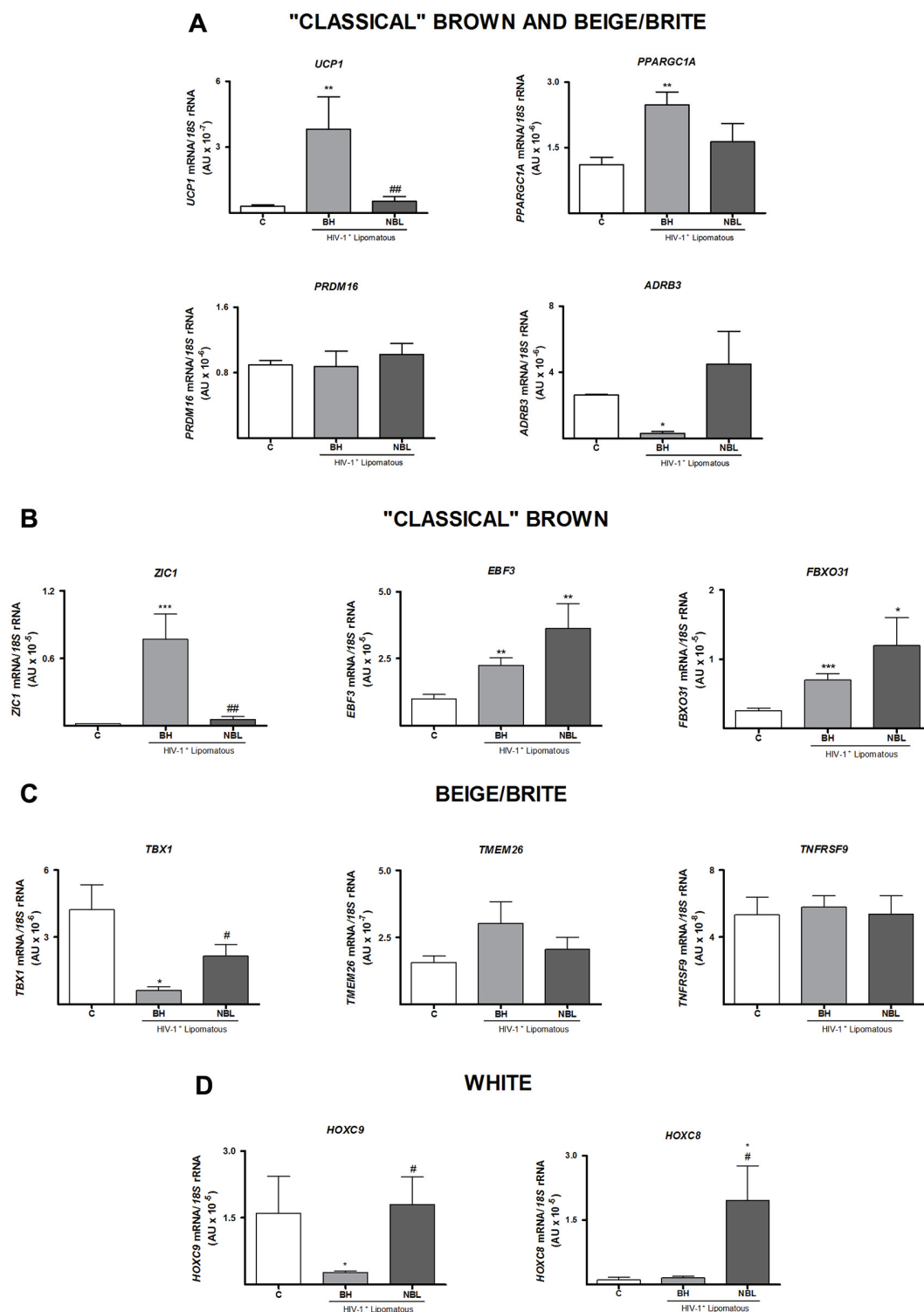


Fig 4. Expression of mRNA for brown adipocyte-associated genes and specific lineage markers of different classes of adipocytes in adipose tissue from BH and NBL lipomas from HIV-1-infected, HAART-treated individuals and in subcutaneous adipose tissue from healthy controls (C). Relative mRNA levels were determined by qRT-PCR. Means \pm SEM of 10 (C, BH) and 8 (NBL) samples, expressed as ratios relative to 18S rRNA, are shown for each target mRNA (* p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001, lipomas vs. healthy subcutaneous adipose tissue; # p <0.05, ## p <0.01 and ### p <0.001, NBL vs. BH lipomas). **A)** Brown adipocyte-associated genes. **B-D)** Specific putative lineage markers of different types of adipocytes.

doi:10.1371/journal.pone.0136571.g004

adipose tissue depots analyzed here. This means that lipid accumulation and hypertrophy alone are not sufficient to explain the adipose enlargement, suggesting that hyperplasia of adipose tissue contributes to adipose depot overgrowth, both in BH and at distinct anatomical sites. Fibrosis, a feature usually found in rapidly proliferating adipose depots that leads to inflammation [38], was not increased, at least not at the transcriptional level. Notably, we found a dramatic reduction in DNA telomere length in both BH and non-BH enlarged adipose depots relative to control healthy adipose tissue, finding that strongly supports the lipomatous character of these adipose sites. Shortening of telomeres is a consequence of tissues having experienced high rates of cell replication, as has previously been reported for adipose depots in obese patients [27,39]. As a non-malignant tumorigenic process, lipomatosis maintains telomere shortening with cell division [40]; this contrasts with malignant tumorigenesis, which evades telomere shortening through activation of telomerase [39,41]. To our knowledge, our current findings represent the first data on telomere length as a marker of cellular behavior in fat depots from HIV-1-infected patients.

The common lipomatous character of BH and non-BH adipose enlargements is also evidenced by the accumulation of the toxic, non-processed form of lamin A, a phenomenon previously reported to take place not only in genetically-determined lipomatosis [29,42] but also in BH from HIV-1-infected, HAART-treated patients [9], as well as in the lipotrophic areas of these individuals. Our results, taken together with previous observations [43,44], suggest that lipomatosis in HIV-1 patients reflects an increased aging phenotype, as evidenced by prelamin A accumulation, telomere length reduction and enhanced expression of SA- β -Galactosidase. In contrast to lipotrophic areas, hyperproliferative lipomas would therefore compensate for cell death with accelerated precursor cell turnover, thus growing in size.

Our current findings confirm previous reports indicating partial acquisition of a brown adipose tissue molecular signature in BH. Our demonstration of increased expression of UCP1 is in accord with previous findings [7–9]. The partial acquisition of a brown adipose tissue phenotype is further underscored by the strong repression of β_3 -adrenoreceptor mRNA expression—a common finding in thermogenically activated brown adipose tissue in experimental models [45]. However, non-BH lipomatous sites did not show a remarkable expression of UCP1. Even when non-BH samples from circumferential neck enlarged adipose tissue close to sites where physiological brown adipose tissue is known to be present were analyzed separately, UCP1 expression was negligible. These findings indicate that the acquisition of a partial brown fat-type molecular signature is a specific feature of BH that is not shared by lipomas at other anatomical sites in HIV-1 patients.

This study represents the first use of marker genes proposed to allow the distinction between beige/brite and classical brown fat to characterize the brown fat-like features of BH. Our finding of very high expression of *ZIC1*, possibly the most specific, and best accepted, marker of classical, non-beige/brite, brown adipocytes [19–21,46], indicates that abnormal classical brown adipogenesis underlies the BH phenotype.

The suppressed expression of *HOXC9*, a proposed marker of the white-versus-brown phenotype [19,20], specifically in BH further supports the shift from white to brown adipogenesis in BH. The information obtained regarding a putative beige/brite phenotype was less conclusive, as only some increase in NBL versus BH expression was found. In fact, the determination of classical brown-versus-beige/brite phenotype made on the basis of marker gene expression analysis should be considered with caution, considering how recently these markers, the lack of unanimous agreement on their use and scarce validation in humans tissue of data obtained in rodents [46–48]. In this context, some studies have reported that *TMEM26* is preferentially found in human BAT [17,32] whereas others have reported no differences between BAT and WAT [19,20]. The value of *TNFRSF9* (*CD137*) as bona-fide beige marker has also been

questioned, and a recent comprehensive compilation of available data suggested that, whereas *ZIC1* is emerging as a bona-fide marker of “classical” BAT in humans, the validity of beige/briter markers in human adipose tissues is less compelling [46].

Overall, our findings strongly support the conclusion that a brown fat-like phenotype related to the classical brown adipocyte cell lineage is specifically induced in HIV-1-associated BH but not in lipomas at other anatomical sites. Recent reports have claimed that adipocytes of the classical brown type are present in human adults [19,20]; thus, it is likely that a specific distortion of this cell type elicited by HIV-1 infection and/or antiretroviral treatment underlies the etiopathology of BH lipomatosis.

The present study has obvious limitation: the relative scarcity of samples in this type of studies, the anatomical variability of NBL location, the impossibility to perform the study in distinct lipomas from the same individual, and the single molecular approach followed. We were nonetheless able to conclude that BH and adipose enlargements that occur at different anatomical sites in HIV-1-infected, HAART-treated patients share a similar lipomatous character and the absence of a local pro-inflammatory status. However, only BH exhibited a distortion in the brown-to-white molecular signature that appears to involve the classical brown adipocyte cell lineage. Overall, the present data provide evidence that HIV-1 infection and antiretroviral toxicity-mediated alterations in adipose tissue plasticity may differentially impact distinct anatomical sites according to a distinct molecular signature of affected tissue areas. Although our data allow few conclusions to be reached regarding prevention or treatment of this alteration, they suggest that proposals to promote brown adipose tissue activation as a tool for improving the metabolic syndrome, especially as it applies to HIV-1-infected patients, should therefore be considered with caution in the future.

Supporting Information

S1 Table. Reference numbers for the TaqMan probes used in the gene expression experiments conducted in this study.

(DOC)

S2 Table. mRNA and protein levels of adipogenesis and adipocyte function, mitochondrial function, inflammation, fibrosis, proliferation and brown-versus-white marker genes of subcutaneous adipose tissue from the upper body and lower body region of healthy controls (C) and non-buffalo lipomas (NBL).

(DOC)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FV MG PD. Performed the experiments: RC JMGE RM JV. Analyzed the data: RC JMGE RM JV MG FV EM. Contributed reagents/materials/analysis tools: JCD JF MdMG MGM PD EM. Wrote the paper: FV MG RC.

References

1. Vigouroux C, Gharakhanian S, Salhi Y, Nguyen TH, Adda N, Rozenbaum W et al. (1999) Adverse metabolic disorders during highly active antiretroviral treatments (HAART) of HIV disease. *Diabetes Metab* 25: 383–392. PMID: [10592860](#)
2. Villarroya F, Domingo P, Giralt M (2007) Lipodystrophy in HIV 1-infected patients: lessons for obesity research. *Int J Obes (Lond)* 31: 1763–1776.
3. Lo JC, Mulligan K, Tai VW, Algren H, Schambelan M (1998) "Buffalo hump" in men with HIV-1 infection. *Lancet* 351: 867–870. PMID: [9525364](#)

4. Guaraldi G, Orlando G, Squillace N, Roverato A, De Fazio D, Vandelli M et al. (2007) Prevalence of and risk factors for pubic lipoma development in HIV-infected persons. *J Acquir Immune Defic Syndr* 45: 72–76. PMID: [17460472](#)
5. Tierney EP, Hanke CW (2010) "Bullfrog neck", a unique morphologic trait in HIV lipodystrophy: case series and review of the literature. *Arch Dermatol* 146: 1279–1282. doi: [10.1001/archdermatol.2010.341](#) PMID: [21079066](#)
6. Palella FJ Jr., Chmiel JS, Riddler SA, Calhoun B, Dobs A, Visscher B et al. (2006) A novel pattern of lipoaccumulation in HIV-infected men. *JAMA* 296: 766–768. PMID: [16905782](#)
7. Guallar JP, Gallego-Escuredo JM, Domingo JC, Alegre M, Fontdevila J, Martínez E et al. (2008) Differential gene expression indicates that 'buffalo hump' is a distinct adipose tissue disturbance in HIV-1-associated lipodystrophy. *AIDS* 22: 575–584. doi: [10.1097/QAD.0b013e3282f56b40](#) PMID: [18316998](#)
8. Rodriguez de la Concepcion ML, Domingo JC, Domingo P, Giral M, Villarroja F (2004) Uncoupling protein 1 gene expression implicates brown adipocytes in highly active antiretroviral therapy-associated lipomatosis. *AIDS* 18: 959–960. PMID: [15060448](#)
9. Bereziat V, Cervera P, Le Dour C, Verpont MC, Dumont S, Vantygem MC et al. (2011) LMNA mutations induce a non-inflammatory fibrosis and a brown fat-like dystrophy of enlarged cervical adipose tissue. *Am J Pathol* 179: 2443–2453. doi: [10.1016/j.ajpath.2011.07.049](#) PMID: [21945321](#)
10. Torriani M, Fitch K, Stavrou E, Bredella MA, Lim R, Sass CA et al. (2012) Deiodinase 2 expression is increased in dorsocervical fat of patients with HIV-associated lipohypertrophy syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 97: E602–607. doi: [10.1210/jc.2011-2951](#) PMID: [22259052](#)
11. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB et al. (2009) Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 360: 1509–1517. doi: [10.1056/NEJMoa0810780](#) PMID: [19357406](#)
12. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J et al. (2009) High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 58: 1526–1531. doi: [10.2337/db09-0530](#) PMID: [19401428](#)
13. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND et al. (2009) Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 360: 1500–1508. doi: [10.1056/NEJMoa0808718](#) PMID: [19357405](#)
14. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T et al. (2009) Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 360: 1518–1525. doi: [10.1056/NEJMoa0808949](#) PMID: [19357407](#)
15. Gallego-Escuredo JM, Domingo P, Fontdevila J, Villarroja J, Domingo JC, Martínez E et al. (2013) Hypertrophied facial fat in an HIV-1-infected patient after autologous transplantation from 'buffalo hump' retains a partial brown-fat-like molecular signature. *Antivir Ther* 18: 635–639. doi: [10.3851/IMP2528](#) PMID: [23344424](#)
16. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. (2010) Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* 285: 7153–7164. doi: [10.1074/jbc.M109.053942](#) PMID: [20028987](#)
17. Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L et al. (2012) Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One* 7: e49452. doi: [10.1371/journal.pone.0049452](#) PMID: [23166672](#)
18. Peirce V, Carobbio S, Vidal-Puig A (2014) The different shades of fat. *Nature* 510: 76–83. doi: [10.1038/nature13477](#) PMID: [24899307](#)
19. Cypess AM, White AP, Vernochet C, Schulz TJ, Xue R, Sass CA et al. (2013) Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nat Med* 19: 635–639. doi: [10.1038/nm.3112](#) PMID: [23603815](#)
20. Jespersen NZ, Larsen TJ, Peijs L, Dagaard S, Homoe P, Loft A et al. (2013) A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab* 17: 798–805. doi: [10.1016/j.cmet.2013.04.011](#) PMID: [23663743](#)
21. Lidell ME, Betz MJ, Dahlqvist Leinhard O, Heglind M, Elander L, Slawik M et al. (2013) Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med* 19: 631–634. doi: [10.1038/nm.3017](#) PMID: [23603813](#)
22. Giral M, Domingo P, Guallar JP, Rodriguez de la Concepcion ML, Alegre M, Domingo JC et al. (2006) HIV-1 infection alters gene expression in adipose tissue, which contributes to HIV-1/HAART-associated lipodystrophy. *Antivir Ther* 11: 729–740. PMID: [17310817](#)

23. Mallewa JE, Wilkins E, Vilar J, Mallewa M, Doran D, Back D et al. (2008) HIV-associated lipodystrophy: a review of underlying mechanisms and therapeutic options. *J Antimicrob Chemother* 62: 648–660. doi: [10.1093/jac/dkn251](https://doi.org/10.1093/jac/dkn251) PMID: [18565973](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18565973/)
24. Villarroya F, Domingo P, Giral M (2010) Drug-induced lipotoxicity: lipodystrophy associated with HIV-1 infection and antiretroviral treatment. *Biochim Biophys Acta* 1801: 392–399. doi: [10.1016/j.bbali.2009.09.018](https://doi.org/10.1016/j.bbali.2009.09.018) PMID: [19800025](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19800025/)
25. O'Callaghan NJ, Fenech M (2011) A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biol Proced Online* 13: 3. doi: [10.1186/1480-9222-13-3](https://doi.org/10.1186/1480-9222-13-3) PMID: [21369534](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21369534/)
26. Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S (2007) PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129: 665–679. PMID: [17512402](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17512402/)
27. Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Sabater M, Ricart W, Fernandez-Real JM (2010) Telomere length of subcutaneous adipose tissue cells is shorter in obese and formerly obese subjects. *Int J Obes (Lond)* 34: 1345–1348.
28. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC et al. (2006) Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* 5: 187–195. PMID: [16626397](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16626397/)
29. Araujo-Vilar D, Victoria B, Gonzalez-Mendez B, Barreiro F, Fernandez-Rodriguez B, Cereijo R et al. (2012) Histological and molecular features of lipomatous and nonlipomatous adipose tissue in familial partial lipodystrophy caused by LMNA mutations. *Clin Endocrinol (Oxf)* 76: 816–824.
30. Reddy S, Comai L. (2012) Lamin A, farnesylation and aging. *Exp Cell Res* 318:1–7 doi: [10.1016/j.yexcr.2011.08.009](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.08.009) PMID: [21871450](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21871450/)
31. Walden TB, Hansen IR, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J (2012) Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302: E19–31. doi: [10.1152/ajpendo.00249.2011](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00249.2011) PMID: [21828341](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21828341/)
32. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH et al. (2012) Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150: 366–376. doi: [10.1016/j.cell.2012.05.016](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.016) PMID: [22796012](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22796012/)
33. Ceccarelli G, d'Ettore G, Marchetti F, Rizza C, Mastroianni CM, Carlesimo B et al. (2011) Development of Buffalo Hump in the course of antiretroviral therapy including raltegravir and unboosted atazanavir: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep* 5: 70. doi: [10.1186/1752-1947-5-70](https://doi.org/10.1186/1752-1947-5-70) PMID: [21329500](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21329500/)
34. Kersten S (2014) Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta* 1841:919–933. doi: [10.1016/j.bbali.2014.03.013](https://doi.org/10.1016/j.bbali.2014.03.013) PMID: [24721265](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24721265/)
35. van Beekum O, Fleskens V, Kalkhoven E (2009) Posttranslational modifications of PPAR-gamma: fine-tuning the metabolic master regulator. *Obesity (Silver Spring)* 17:213–219.
36. Shikuma CM, Gangcuangco LM, Killebrew DA, Libutti DE, Chow DC, Nakamoto BK et al. (2014) The role of HIV and monocytes/macrophages in adipose tissue biology. *J Acquir Immune Defic Syndr* 65:151–159 doi: [10.1097/01.qai.0000435599.27727.6c](https://doi.org/10.1097/01.qai.0000435599.27727.6c) PMID: [24091690](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24091690/)
37. Hammond E, McKinnon E, Nolan D. (2010). Human immunodeficiency virus treatment-induced adipose tissue pathology and lipoatrophy: prevalence and metabolic consequences. *Clin Infect Dis* 51:591–599. doi: [10.1086/655765](https://doi.org/10.1086/655765) PMID: [20645860](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20645860/)
38. Sun K, Tordjman J, Clement K, Scherer PE (2013) Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab* 18: 470–477. doi: [10.1016/j.cmet.2013.06.016](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.06.016) PMID: [23954640](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23954640/)
39. Aubert G (2014) Telomere dynamics and aging. *Prog Mol Biol Transl Sci* 125: 89–111. doi: [10.1016/B978-0-12-397898-1.00004-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397898-1.00004-9) PMID: [24993699](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24993699/)
40. Feng B, Zhang T, Xu H (2013) Human adipose dynamics and metabolic health. *Ann N Y Acad Sci* 1281: 160–177. doi: [10.1111/nyas.12009](https://doi.org/10.1111/nyas.12009) PMID: [23317303](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23317303/)
41. Chadeneau C, Hay K, Hirte HW, Gallinger S, Bacchetti S (1995) Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. *Cancer Res* 55: 2533–2536. PMID: [7780964](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7780964/)
42. Shackleton S, Lloyd DJ, Jackson SN, Evans R, Niermeijer MF, Singh BM et al. (2000) LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet* 24: 153–156. PMID: [10655060](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10655060/)
43. Caron-Debarle M, Lagathu C, Boccara F, Vigouroux C, Capeau J (2010) HIV-associated lipodystrophy: from fat injury to premature aging. *Trends Mol Med* 16: 218–229. doi: [10.1016/j.molmed.2010.03.002](https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.03.002) PMID: [20400373](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20400373/)
44. Coffinier C, Hudon SE, Farber EA, Chang SY, Hrycyna CA, Young SG et al. (2007) HIV protease inhibitors block the zinc metalloproteinase ZMPSTE24 and lead to an accumulation of prelamin A in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 13432–13437. PMID: [17652517](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17652517/)
45. Bengtsson T, Redegren K, Strosberg AD, Nedergaard J, Cannon B (1996) Down-regulation of beta3 adrenoreceptor gene expression in brown fat cells is transient and recovery is dependent upon a short-lived protein factor. *J Biol Chem* 271: 33366–33375. PMID: [8969197](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8969197/)

46. de Jong JM, Larsson O, Cannon B, Nedergaard J. (2015) A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 308:E1085–105. doi: [10.1152/ajpendo.00023.2015](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00023.2015) PMID: [25898951](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25898951/)
47. Giralt M, Villarroya F (2013) White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology* 154: 2992–3000. doi: [10.1210/en.2013-1403](https://doi.org/10.1210/en.2013-1403) PMID: [23782940](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23782940/)
48. Scheele C, Larsen TJ, Nielsen S (2014) Novel nuances of human brown fat. *Adipocyte* 3: 54–57. doi: [10.4161/adip.26520](https://doi.org/10.4161/adip.26520) PMID: [24575370](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24575370/)

Gene	TaqMan probe reference number
<i>PPARG</i>	Hs00234592_m1
<i>LPL</i>	Hs00173425_m1
<i>ADIPOQ</i>	Hs00605917_m1
<i>TNF</i>	Hs00174128_m1
<i>CD68</i>	Hs00154355_m1
<i>COL1A2</i>	Hs00164099_m1
<i>MT-CYB</i>	Hs02596867_s1
<i>CEBPA</i>	Hs00269972_s1
<i>UCP1</i>	Hs00222453_m1
<i>PPARGC1A</i>	Hs00173304_m1
<i>PRDM16</i>	Hs00223161_m1
<i>ADRB3</i>	Hs00609046_m1
<i>ZIC1</i>	Hs00602749_m1
<i>EBF3</i>	Hs00406051_m1
<i>FBXO31</i>	Hs00375551_m1
<i>TBX1</i>	Hs00962556_m1
<i>TMEM26</i>	Hs00415619_m1
<i>TNFRSF9</i>	Hs00155512_m1
<i>HOXC8</i>	Hs00224073_m1
<i>HOXC9</i>	Hs00396786_m1
<i>GLB1</i>	Hs01035168_m1
<i>TP53</i>	Hs00153349_m1
<i>18S</i>	Hs99999901_m1

S1 Table: Reference numbers for the TaqMan probes used in the gene expression experiments conducted in this paper.

Gene	Upper body C (n = 5)	Lower body C (n = 5)	Upper body NBL (n = 3)	Lower body NBL (n = 5)
<i>PPARG</i>	$2.9 \cdot 10^{-5} \pm 9.6 \cdot 10^{-6}$	$3.2 \cdot 10^{-5} \pm 5.7 \cdot 10^{-6}$	$5.5 \cdot 10^{-5} \pm 3.5 \cdot 10^{-6}$	$7.2 \cdot 10^{-5} \pm 2.1 \cdot 10^{-6}$
<i>LPL</i>	$1.6 \cdot 10^{-4} \pm 5.1 \cdot 10^{-5}$	$1.8 \cdot 10^{-4} \pm 1.7 \cdot 10^{-5}$	$5.4 \cdot 10^{-4} \pm 1.8 \cdot 10^{-5}$	$7.8 \cdot 10^{-4} \pm 1.2 \cdot 10^{-4}$
<i>ADIPOQ</i> *	$6.1 \cdot 10^{-4} \pm 2.4 \cdot 10^{-4}$	$1.7 \cdot 10^{-3} \pm 2.0 \cdot 10^{-4}$	$2.7 \cdot 10^{-3} \pm 8.8 \cdot 10^{-4}$	$6.2 \cdot 10^{-3} \pm 6.8 \cdot 10^{-4}$
<i>TNF</i>	$1.1 \cdot 10^{-6} \pm 1.2 \cdot 10^{-7}$	$4.7 \cdot 10^{-7} \pm 8.5 \cdot 10^{-8}$	$4.9 \cdot 10^{-7} \pm 1.9 \cdot 10^{-7}$	$5.3 \cdot 10^{-7} \pm 1.2 \cdot 10^{-7}$
<i>CD68</i>	$5.0 \cdot 10^{-5} \pm 1.4 \cdot 10^{-5}$	$4.2 \cdot 10^{-5} \pm 1.2 \cdot 10^{-5}$	$5.3 \cdot 10^{-5} \pm 1.4 \cdot 10^{-5}$	$3.8 \cdot 10^{-5} \pm 8.1 \cdot 10^{-6}$
<i>MT-COII</i> *#	$1.3 \cdot 10^{-2} \pm 2.3 \cdot 10^{-3}$	$6.0 \cdot 10^{-2} \pm 1.1 \cdot 10^{-3}$	$2.9 \cdot 10^{-2} \pm 2.2 \cdot 10^{-2}$	$1.4 \cdot 10^{-1} \pm 3.1 \cdot 10^{-2}$
<i>COL1A2</i>	$5.1 \cdot 10^{-4} \pm 1.2 \cdot 10^{-4}$	$5.0 \cdot 10^{-4} \pm 1.6 \cdot 10^{-4}$	$3.3 \cdot 10^{-4} \pm 4.8 \cdot 10^{-5}$	$3.7 \cdot 10^{-4} \pm 6.7 \cdot 10^{-5}$
<i>UCP1</i>	$3.1 \cdot 10^{-8} \pm 5.4 \cdot 10^{-9}$	$2.0 \cdot 10^{-8} \pm 1.4 \cdot 10^{-8}$	$3.9 \cdot 10^{-8} \pm 2.4 \cdot 10^{-8}$	$5.5 \cdot 10^{-8} \pm 3.3 \cdot 10^{-8}$
<i>PPARGC1A</i>	$1.4 \cdot 10^{-6} \pm 1.3 \cdot 10^{-7}$	$8.4 \cdot 10^{-7} \pm 6.5 \cdot 10^{-8}$	$1.4 \cdot 10^{-6} \pm 7.2 \cdot 10^{-7}$	$1.5 \cdot 10^{-6} \pm 2.1 \cdot 10^{-7}$
<i>PRDM16</i>	$8.3 \cdot 10^{-7} \pm 5.6 \cdot 10^{-8}$	$9.7 \cdot 10^{-7} \pm 8.5 \cdot 10^{-8}$	$1.3 \cdot 10^{-6} \pm 1.6 \cdot 10^{-7}$	$8.0 \cdot 10^{-7} \pm 3.5 \cdot 10^{-7}$
<i>ADRB3</i>	$2.7 \cdot 10^{-6} \pm 1.7 \cdot 10^{-7}$	$2.5 \cdot 10^{-6} \pm 4.8 \cdot 10^{-7}$	$2.1 \cdot 10^{-6} \pm 1.2 \cdot 10^{-6}$	$3.6 \cdot 10^{-6} \pm 1.7 \cdot 10^{-6}$
<i>ZIC1</i>	$2.2 \cdot 10^{-7} \pm 4.4 \cdot 10^{-8}$	$1.3 \cdot 10^{-7} \pm 6.2 \cdot 10^{-8}$	$1.0 \cdot 10^{-6} \pm 5.8 \cdot 10^{-7}$	$5.3 \cdot 10^{-8} \pm 2.9 \cdot 10^{-8}$
<i>EBF3</i>	$1.6 \cdot 10^{-5} \pm 7.2 \cdot 10^{-6}$	$2.0 \cdot 10^{-5} \pm 1.2 \cdot 10^{-5}$	$3.7 \cdot 10^{-5} \pm 2.8 \cdot 10^{-5}$	$3.9 \cdot 10^{-5} \pm 1.8 \cdot 10^{-5}$
<i>FBXO31</i>	$3.1 \cdot 10^{-6} \pm 1.1 \cdot 10^{-6}$	$1.7 \cdot 10^{-6} \pm 1.2 \cdot 10^{-6}$	$8.4 \cdot 10^{-6} \pm 4.7 \cdot 10^{-6}$	$1.4 \cdot 10^{-5} \pm 7.7 \cdot 10^{-6}$
<i>TBX1</i>	$2.2 \cdot 10^{-6} \pm 5.4 \cdot 10^{-7}$	$6.3 \cdot 10^{-7} \pm 1.2 \cdot 10^{-7}$	$2.8 \cdot 10^{-6} \pm 1.2 \cdot 10^{-6}$	$2.2 \cdot 10^{-6} \pm 7.3 \cdot 10^{-7}$
<i>TMEM26</i>	$2.7 \cdot 10^{-7} \pm 1.9 \cdot 10^{-8}$	$1.1 \cdot 10^{-7} \pm 7.6 \cdot 10^{-8}$	$1.7 \cdot 10^{-7} \pm 7.7 \cdot 10^{-8}$	$2.4 \cdot 10^{-7} \pm 1.4 \cdot 10^{-8}$
<i>TNFRSF9</i>	$5.1 \cdot 10^{-4} \pm 1.2 \cdot 10^{-4}$	$5.0 \cdot 10^{-4} \pm 1.6 \cdot 10^{-4}$	$5.5 \cdot 10^{-8} \pm 3.1 \cdot 10^{-8}$	$6.2 \cdot 10^{-8} \pm 3.8 \cdot 10^{-8}$
<i>HOXC9</i>	$8.1 \cdot 10^{-6} \pm 3.2 \cdot 10^{-6}$	$2.5 \cdot 10^{-5} \pm 2.6 \cdot 10^{-6}$	$1.5 \cdot 10^{-5} \pm 8.5 \cdot 10^{-6}$	$2.5 \cdot 10^{-5} \pm 9.6 \cdot 10^{-6}$
<i>HOXC8</i>	$4.1 \cdot 10^{-7} \pm 1.8 \cdot 10^{-7}$	$1.8 \cdot 10^{-6} \pm 6.6 \cdot 10^{-7}$	$1.6 \cdot 10^{-5} \pm 3.1 \cdot 10^{-6}$	$7.6 \cdot 10^{-5} \pm 2.7 \cdot 10^{-5}$
Protein				
PPAR γ	29.7 ± 7.4	34.7 ± 5.9	37.6 ± 5.7	37.3 ± 4.7
LPL	12.9 ± 2.8	14.8 ± 3.5	20.1 ± 0.4	17.6 ± 2.3
GLUT4	13.7 ± 3.0	11.0 ± 1.6	11.2 ± 0.7	9.7 ± 1.5
ADIPOQ	1.6 ± 0.1	1.3 ± 0.7	3.8 ± 0.8	2.1 ± 0.7
B ₂ M	306.8 ± 68.8	335.3 ± 95.2	313.5 ± 20.6	301.0 ± 9.7
MT-COII	86.6 ± 1.1	70.2 ± 8.1	26.6 ± 9.5	23.7 ± 11.0
PCNA	1.3 ± 0.5	1.1 ± 0.2	38.8 ± 10.3	75.3 ± 17.6

S2 Table: mRNA and protein levels of adipogenesis and adipocyte function, mitochondrial function, inflammation, fibrosis, proliferation and brown-versus-white marker genes of subcutaneous adipose tissue from the upper body and lower body region of healthy controls (C) and non-buffalo lipomas (NBL). Means \pm SEM are shown for each mRNA concentration (expressed as ratios relative to 18S rRNA) and for each western blot band quantification data for proteins (expressed as ratios of each band's optical density corrected for total protein quantification). Differences were considered to be statistically significant when $P < 0.05$. Statistical differences between upper and lower regions are shown as * for C or as # for NBL whenever significant.

Impact of elvitegravir on human adipocytes: Alterations in differentiation, gene expression and release of adipokines and cytokines

Revista: Antiviral Research

PMID: 27216995

Título: *Impacto del elvitegravir sobre adipocitos humanos: alteraciones en la diferenciación, expresión génica y liberación de adipoquinas y citoquinas.*

Resumen:

El elvitegravir es un inhibidor de la integrasa desarrollado recientemente para el tratamiento antirretroviral de la infección por el VIH. La aparición de efectos secundarios, incluyendo alteraciones en el metabolismo lipídico y en la función y la distribución del tejido adiposo, son preocupaciones comunes asociadas con los regímenes de tratamientos antirretrovirales. Este trabajo es el primer estudio sobre los efectos del elvitegravir sobre la diferenciación de los adipocitos humanos, así como sobre la expresión génica y la secreción de adipoquinas y citoquinas. Lo hacemos en comparación con el efavirenz, un inhibidor de la transcriptasa reversa no análogo de nucleósidos; y el raltegravir, otro inhibidor de la integrasa. Se observó que el elvitegravir alteraba adipogénesis y el metabolismo de los adipocitos de un modo dosis-dependiente, retrasando la adquisición de la morfología típica del adipocito maduro e inhibiendo la expresión de genes clave en la adipogénesis como PPAR γ , el transportador de glucosa GLUT4, la lipoproteína lipasa y las adipoquinas adiponectina y leptina. En comparación con el efavirenz, los efectos del elvitegravir fueron similares, pero tendieron a ocurrir al utilizar concentraciones más altas de fármaco. A concentraciones similares, el elvitegravir produjo una menor inducción en la expresión y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias. Además, el efavirenz

produjo una marcada inducción en la expresión y liberación de interleuquina 8. El raltegravir, por su parte, no produjo ninguna alteración, ni sobre el proceso de diferenciación ni tampoco sobre la expresión y la liberación de adipoquinas y citoquinas. En conclusión, podemos decir que elvitegravir altera la diferenciación y la función de los adipocitos y promueve la inducción de citoquinas pro-inflamatorias de forma similar al efavirenz, pero con menor intensidad a igualdad de concentraciones. Serían necesarios nuevos estudios y el seguimiento del metabolismo lipídico y de la función del tejido adiposo de los pacientes que siguen regímenes basados en elvitegravir, ya que no se puede anticipar un efecto neutro de este nuevo fármaco sobre el tejido adiposo.



Short communication

Impact of elvitegravir on human adipocytes: Alterations in differentiation, gene expression and release of adipokines and cytokines



Ricardo Moure^a, Pere Domingo^b, José M. Gallego-Escuredo^a, Joan Villarroya^{a,b},
 Maria del Mar Gutierrez^b, Maria G. Mateo^b, Joan C. Domingo^a, Marta Giralt^a,
 Francesc Villarroya^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institut de Biomedicina (IBUB), University of Barcelona, CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Barcelona, Spain

^b Infectious Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Autonomous University of Barcelona and Red de Investigación en SIDA (RIS), Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 December 2015

Received in revised form

19 April 2016

Accepted 17 May 2016

Available online 20 May 2016

Keywords:

Adipocyte

Elvitegravir

Efavirenz

Lipodystrophy

Adipokine

Cytokine

ABSTRACT

Elvitegravir is a recently developed integrase inhibitor used for antiretroviral treatment of HIV infection. Secondary effects, including disturbances in lipid metabolism and, ultimately, in adipose tissue distribution and function, are common concerns associated with antiretroviral treatments. Here, we provide the first study of the effects of elvitegravir (in comparison with efavirenz, a non-nucleoside analog inhibitor of reverse transcriptase; and raltegravir, another integrase inhibitor) on human adipocyte differentiation, gene expression and secretion of adipokines and cytokines. Elvitegravir impaired adipogenesis and adipocyte metabolism in human SGBS adipocytes in a concentration-dependent manner (delaying acquisition of adipocyte morphology and reducing the expression of adipogenesis marker genes such as PPAR γ , glucose transporter GLUT4, lipoprotein lipase, and the adipokines adiponectin and leptin). Compared with efavirenz, the effects of elvitegravir were similar but tended to occur at higher concentrations than those elicited by efavirenz, or were somewhat less intense than those caused by efavirenz at similar concentration. Elvitegravir tended to cause a more moderate induction of pro-inflammatory cytokines than efavirenz. Efavirenz induced a marked concentration-dependent increase in interleukin-8 expression and release whereas elvitegravir had little effect. Raltegravir had totally neutral actions of adipogenesis, adipocyte metabolism-related gene expression and release of adipokines and cytokines. In conclusion, elvitegravir alters adipocyte differentiation and function and promotes induction of pro-inflammatory cytokines similarly to efavirenz, but several effects were less intense. Further assessment of lipid metabolism and adipose tissue function in patients administered elvitegravir-based regimes is advisable considering that totally neutral effects of elvitegravir on lipid homeostasis cannot be anticipated from the current study in vitro.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Antiretroviral treatment of HIV patients has been based on a combination of two nucleoside-analog reverse transcriptase inhibitors (NRTI) and either a non-nucleoside analog inhibitor of reverse transcriptase (NNRTI) or a protease inhibitor. These combinations, although usually successful in the control of disease progression, are associated with metabolic disturbances, mainly

dyslipidemia, insulin resistance and, in some cases, overt lipodystrophy (Giralt et al., 2011). Some drugs, especially the NRTIs stavudine and zidovudine, are especially prone to cause lipodystrophy whereas protease inhibitors are considered to promote insulin resistance and dyslipidemia. NNRTIs have not traditionally been associated with adipose alterations. However, efavirenz, once the preferred NNRTI for use in antiretroviral regimens (Hammer et al., 2008; Gazzard et al., 2008), has been reported to favor altered patterns of circulating lipids and fat loss (Pérez-Molina et al., 2008; Riddler et al., 2008; Haubrich et al., 2009).

* Corresponding author. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona, Avda Diagonal 643, E-08028, Barcelona, Spain.

E-mail address: fvillarroya@ub.edu (F. Villarroya).

Inhibitors of the HIV integrase enzyme represent the latest class of antiretroviral drugs for HIV treatment. Three drugs (raltegravir, dolutegravir and elvitegravir) that target the strand-transfer step of integration of viral DNA into the host cell chromosomal DNA have been developed (Blanco et al., 2015). These drugs are gaining a relevant role in HIV antiretroviral therapy because of their favorable clinical characteristics. Elvitegravir is an integrase inhibitor co-formulated with cobicistat, a pharmacological inhibitor of elvitegravir metabolism (Cohen et al., 2011). Elvitegravir has shown high antiviral efficacy and tolerability as well as low secondary effects. Accordingly, regimens containing elvitegravir are being promoted as first-line treatment for HIV-1-infected patients. The potential effects of elvitegravir on lipid alterations have only begun to be assessed. Elvitegravir (as part of an elvitegravir-cobicistat-tenofovir-emtricitabine combination) leads to increased cholesterol levels relative to ritonavir-atazanavir but cause a less intense increase in triglycerides (Rockstroh et al., 2013). Total cholesterol, LDL cholesterol and HDL cholesterol are more moderately increased in patients under elvitegravir containing regimens than in those containing efavirenz (Sax et al., 2012).

Studies on the effects of antiretroviral drugs on human adipose cells provide initial pre-clinical information regarding the potential of drugs to alter adipose tissue and lipid metabolism. Such analyses have shown that efavirenz strongly impairs adipocyte differentiation and induces the secretion of pro-inflammatory cytokines (El Hadri et al., 2004; Gallego-Escuredo et al., 2010; Díaz-Delfin et al., 2011, 2012). The potential effects of elvitegravir on adipose cells have not been studied. Here, we analyzed the effects of elvitegravir on adipogenesis and the release of adipokines and cytokines by human adipose cells in comparison with the effects of efavirenz and raltegravir.

Human SGBS (Simpson-Golabi-Behmel syndrome) pre-adipocytes were used (Wabitsch et al., 2001; Schlüter et al., 2002). SGBS pre-adipocytes were maintained in DMEM/F12 containing 10% fetal bovine serum. After cells had become confluent, adipogenic differentiation was initiated by incubating cells for 4 days in serum-free medium containing 20 nM insulin, 0.2 nM triiodothyronine (T_3) and 100 nM cortisol, supplemented with 25 nM dexamethasone, 500 μ M 3-isobutyl-methyl-xanthine and 2 μ M rosiglitazone. Subsequently, the cells were switched to differentiation medium (containing insulin, T_3 , and cortisol only) and maintained for up to 16 days.

Cytotoxicity was determined after exposing differentiating preadipocytes to drugs (0.1 μ M–5 μ M range) for 5 days (CytoTox96, Promega). Briefly, cytotoxicity was calculated as lactate dehydrogenase activity in the cell culture medium relative to the maximum release after total cell lysis of cells. Neither elvitegravir nor efavirenz or raltegravir caused a significant cytotoxicity (Supplemental Table 2). This is similar to previous reports on other cell types, where significant cytotoxicity of elvitegravir has been reported only at concentrations higher than the maximal concentration (5 μ M) tested here; for example, the 50% cytotoxic concentration (EC_{50}) of elvitegravir toward human renal proximal tubule cells is 13.7 μ M (Stray et al., 2013).

For studies on the effects of drugs on adipogenic differentiation, drug treatments were initiated on day 0 and continued throughout the differentiation process. The effects of drugs on morphological differentiation of adipocytes was determined by using the Image J software to phase-contrast microscopy images to quantify the cell culture surface occupied by differentiated (lipid droplet-containing) cells. Data were expressed as percentages relative to control cultures.

RNA and DNA were extracted using an affinity column-based method (Machery-Nagel). Reverse transcription was performed using random hexamer primers (Applied Biosystems) and 0.5 μ g

RNA. Polymerase chain reaction (PCR) was conducted in an ABI/Prism-7700 Sequence Detector System using 25 μ l of reaction mixture containing 1 μ l of cDNA, 12.5 μ l of TaqMan Universal PCR Master Mix, 250 nM probes and 900 nM primers (TaqMan; Applied Biosystems, see Supplemental Table 1). Controls with no RNA, primers, or reverse transcriptase were included. Each sample was run in duplicate and the mean value of the duplicate was used to calculate the relative amount of individual mRNAs. Each mean value was normalized to that of the 18S rRNA gene using the comparative ($2^{-\Delta CT}$) method. Relative mitochondrial DNA (mtDNA) levels were quantified using the primers/probe for the mtDNA-encoded cytochrome-b gene and expressed relative to nuclear DNA levels, determined by amplification of the intronless gene C/EBP α , as previously reported (Gallego-Escuredo et al., 2010).

For quantification of adipokines and cytokines released by adipocytes, 25 μ l of medium collected from the last 5 days of adipocyte cultures before harvest were used. Adiponectin, leptin, MCP-1, IL-6, IL-8, total plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1), hepatocyte growth factor (HGF) and nerve growth factor (NGF) were quantified using a multiplex analysis system (Linco Research/Millipore) and a Luminex100ISv2 instrument. Where appropriate, statistical analyses were performed using multivariate ANOVA and post-hoc Turkey tests for paired comparisons, significance is indicated in the text.

Effects of elvitegravir, efavirenz and raltegravir on adipogenic differentiation of human SGBS pre-adipocytes were tested over a concentration range of 0.1–5 μ M (Fig. 1). Exposure of cells to elvitegravir up to 0.5 μ M had no effect on the acquisition of an adipocyte morphology, as evidenced by unaltered lipid accumulation in cells. However, at higher concentrations, elvitegravir caused a significant concentration-dependent reduction in adipogenesis, strongly impairing adipocyte differentiation at 1 μ M and completely abolishing it at 5 μ M. Compared with elvitegravir, efavirenz was somewhat more potent, significantly inhibiting adipocyte differentiation at 0.5 μ M, 1 μ M (83% inhibition, versus 37% inhibition by elvitegravir, $P < 0.05$), 2 μ M (94% inhibition, versus 80% inhibition by elvitegravir, $P < 0.05$) and 5 μ M (Fig. 1). Raltegravir did not alter adipogenic differentiation at any concentration tested (see Fig. 2).

Elvitegravir caused a concentration-dependent suppression of the expression of genes involved in adipogenic differentiation, in a pattern essentially similar to that elicited by efavirenz. Both elvitegravir and efavirenz treatment significantly decreased the expression of C/EBP α , a master transcription factor controlling adipogenesis, at concentrations of 1 μ M and higher. Both drugs caused a similar concentration-dependent suppression of the expression of PPAR γ , the other master regulator of adipogenesis, although only efavirenz significantly reduced PPAR γ expression at 1 μ M. Expression of lipoprotein lipase, a marker gene encoding a key enzyme involved in lipid accumulation in adipocytes, was significantly reduced even at lower concentrations (0.1 μ M) of elvitegravir and efavirenz. Notably, the expression of GLUT4, the gene encoding the insulin-dependent glucose transporter in adipocytes, was also repressed by both drugs in a concentration-dependent manner, but the extent of repression at equivalent concentrations (1 and 2 μ M) was greater for efavirenz than for elvitegravir. With respect to adipokines, both elvitegravir and efavirenz inhibited expression of the adiponectin gene expression in a similar concentration-dependent manner but, at low concentrations (0.1 and 0.5 μ M) only the inhibitory effect of efavirenz was statistically significant. Effects on leptin gene expression were much less pronounced, although efavirenz significantly reduced it at higher concentrations (1 and 5 μ M); in contrast, elvitegravir had no effect on leptin mRNA levels. Overall, these results were in contrast with the lack of effects of raltegravir on the expression of

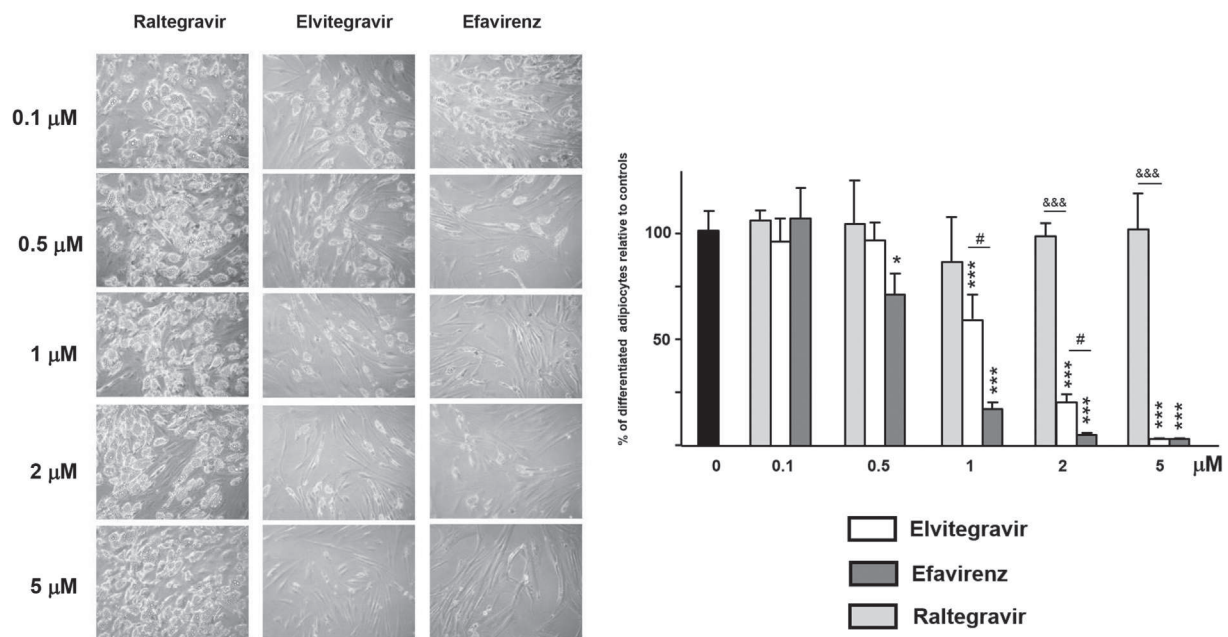


Fig. 1. Effects of elvitegravir on adipogenic differentiation of SGBS human preadipocytes in culture. SGBS human preadipocytes were differentiated in culture in the presence of the indicated concentrations of drugs. A, Representative photomicrographs of adipocyte cell cultures differentiating in the presence of the indicated concentrations of drugs. B, Bars are means \pm SEM of the extent of morphological adipocyte differentiation and are expressed relative to values from untreated control cells, defined as 100% (see Methods). (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ for each drug treatment vs. control; # $P < 0.05$ for elvitegravir vs. efavirenz treatment at the same concentration, \$\$\$ $P < 0.001$ for elvitegravir vs. raltegravir treatment at the same concentration).

the adipocyte-related genes and adipokine genes.

Elvitegravir and efavirenz exerted similar effects on the expression of the genes encoding the pro-inflammatory cytokines IL-6 and MCP-1, inducing an increase in mRNA only at the highest concentration tested (5 μ M); in the case of efavirenz the increase in IL-6 expression did not reach statistical significance. Notably, elvitegravir and efavirenz differentially affected IL-8 expression. Efavirenz caused a marked concentration-dependent induction, that was statistically significant at concentrations higher than 0.5 μ M, whereas elvitegravir induced a significant increase in IL-8 expression only at concentration 5 μ M. In fact, at concentration 5 μ M efavirenz caused a stronger induction of IL-8 expression (close to 30-fold) than elvitegravir (less than 5-fold). Raltegravir did not affect the expression of genes encoding cytokines.

Finally, we determined the effects of efavirenz and elvitegravir on mitochondrial toxicity, assessed by determining the expression of both a mtDNA-encoded transcript (cytochrome-b) and a nuclear-encoded transcript (cytochrome oxidase subunit-IVA). Both drugs impaired the expression of both transcripts, but only at concentrations of 1 μ M and above. However, relative mtDNA levels were unaltered even at concentrations 2 and 5 μ M efavirenz and elvitegravir (Supplemental Table 3). Raltegravir did not alter mitochondrial transcripts or mtDNA levels at the concentrations tested.

We further analyzed the effects of 0.5 and 2 μ M elvitegravir and efavirenz (the concentrations at which most differential effects of the two drugs on differentiation and gene expression had been observed) on the release of adipokines and cytokines into the medium (Fig. 3). Elvitegravir and efavirenz induced a similar decrease in the levels of released adiponectin at both concentrations tested. Levels of secreted leptin were moderately reduced only by efavirenz at 2 μ M, a concentration at which elvitegravir had no effect. Release of the pro-inflammatory cytokine IL-6 by adipocytes was significantly higher following efavirenz treatment than elvitegravir treatment at a concentration of 2 μ M. Consistent with the results of gene expression analysis, efavirenz significantly

induced the release of IL-8 at both 0.5 and 2 μ M whereas elvitegravir had no effect. Similarly, efavirenz, but not elvitegravir, induced MCP-1 release at both 0.5 and 2 μ M. No effects were found for raltegravir on the release of adipokines and cytokines. Other molecules that are known to be released by adipocytes and influence metabolic and inflammatory signaling such as PAI-1, HGF and NGF (Alessi et al., 2007; Bell et al., 2008; Bulló et al., 2007) were not significantly altered by any of the three drugs at any of the concentrations tested.

Collectively, our current data provide the first assessment of the action of the integrase inhibitor elvitegravir on human adipocytes. We found that elvitegravir impairs the acquisition of adipocyte morphology, inhibits the expression of genes controlling adipogenesis (PPAR γ , C/EBP α) and lipid accretion (lipoprotein lipase, GLUT4), and reduces the release of adipokines. The effects of elvitegravir were qualitatively similar to those of efavirenz reported previously in closely related human cell culture models (Gallego-Escuredo et al., 2010; Díaz-Delfin et al., 2011, 2012). An analysis of the effects of efavirenz and elvitegravir at similar concentrations, especially in the range between 0.5 and 2 μ M, indicated that efavirenz exerted similar but somewhat stronger deleterious effects on adipogenesis (e.g. adipose morphology, PPAR γ and GLUT4 expression) than elvitegravir. The most remarkable differential effect of elvitegravir and efavirenz was related to the actions of the drugs on IL-8 expression and release, which was dramatically induced by efavirenz but less altered by elvitegravir. IL-8 is produced and secreted by human adipocytes, in addition to macrophages and monocytes, and plays a role in the induction of pro-inflammatory responses (Bruun et al., 2000, 2001). Increased expression of IL-8 in adipose tissue from HIV patients, especially under conditions of lipodystrophy, has been reported and is expected to contribute to the local pro-inflammatory environment in fat from these patients (Lihn et al., 2003). The differential effects of elvitegravir and efavirenz on the release of regulatory molecules by adipose tissue may be especially relevant in relation to the effects of

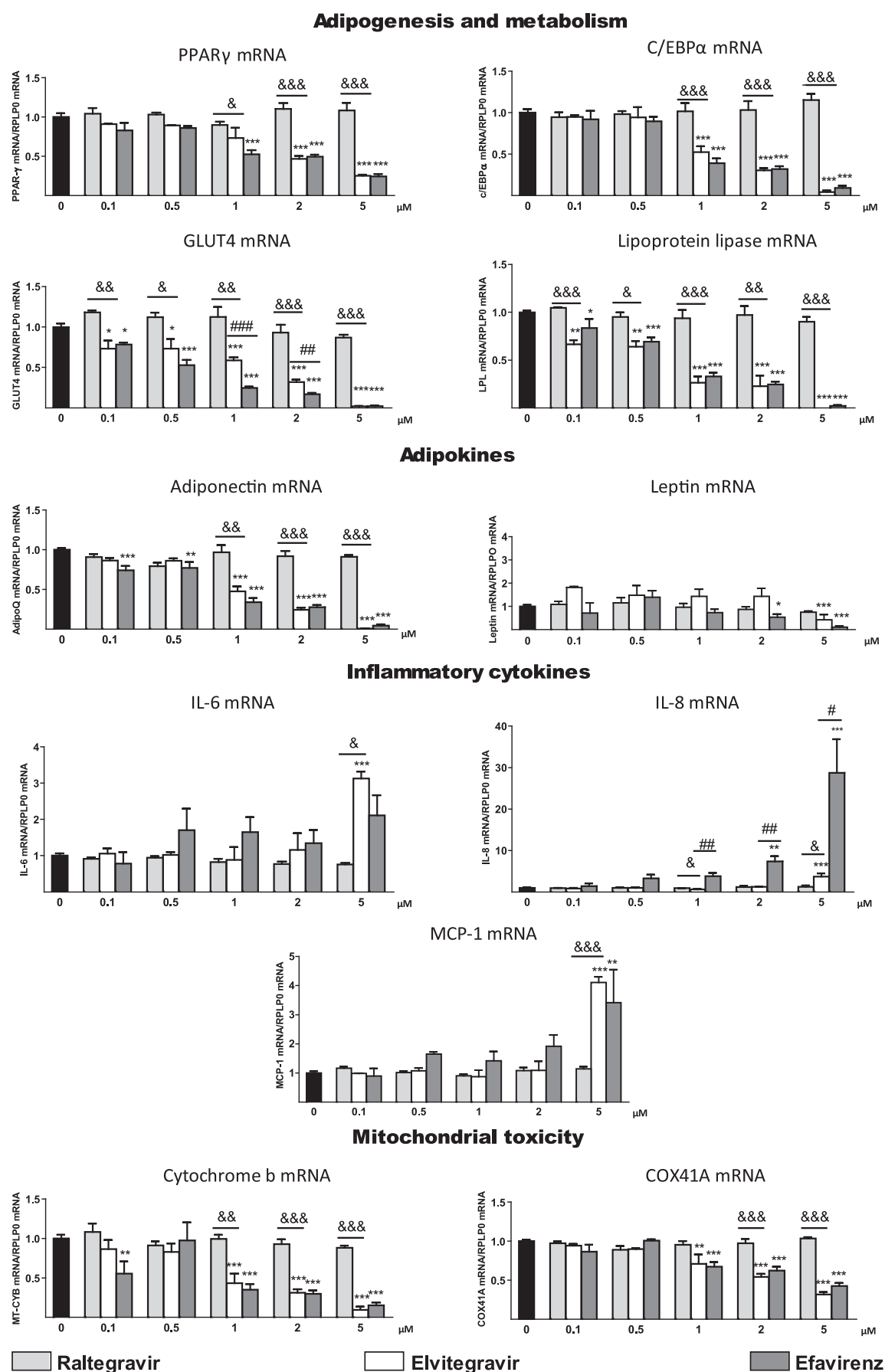


Fig. 2. Effects of elvitegravir on the expression of genes related to adipogenic function, inflammation and mitochondrial toxicity in SGBS human adipocytes differentiating in culture. SGBS human preadipocytes were differentiated in culture in the presence of the indicated concentrations of drugs. Data on mRNA levels are presented as means \pm SEM from 4 to 5 independent experiments, and are expressed relative to values from untreated control cells (defined as 1). * P < 0.05, ** P < 0.01, and *** P < 0.001 for each drug treatment vs. control; # P < 0.05 for elvitegravir vs. efavirenz treatment at the same concentration; & P < 0.05, && P < 0.01, &&& P < 0.001 for elvitegravir vs. raltegravir treatment at the same concentration.

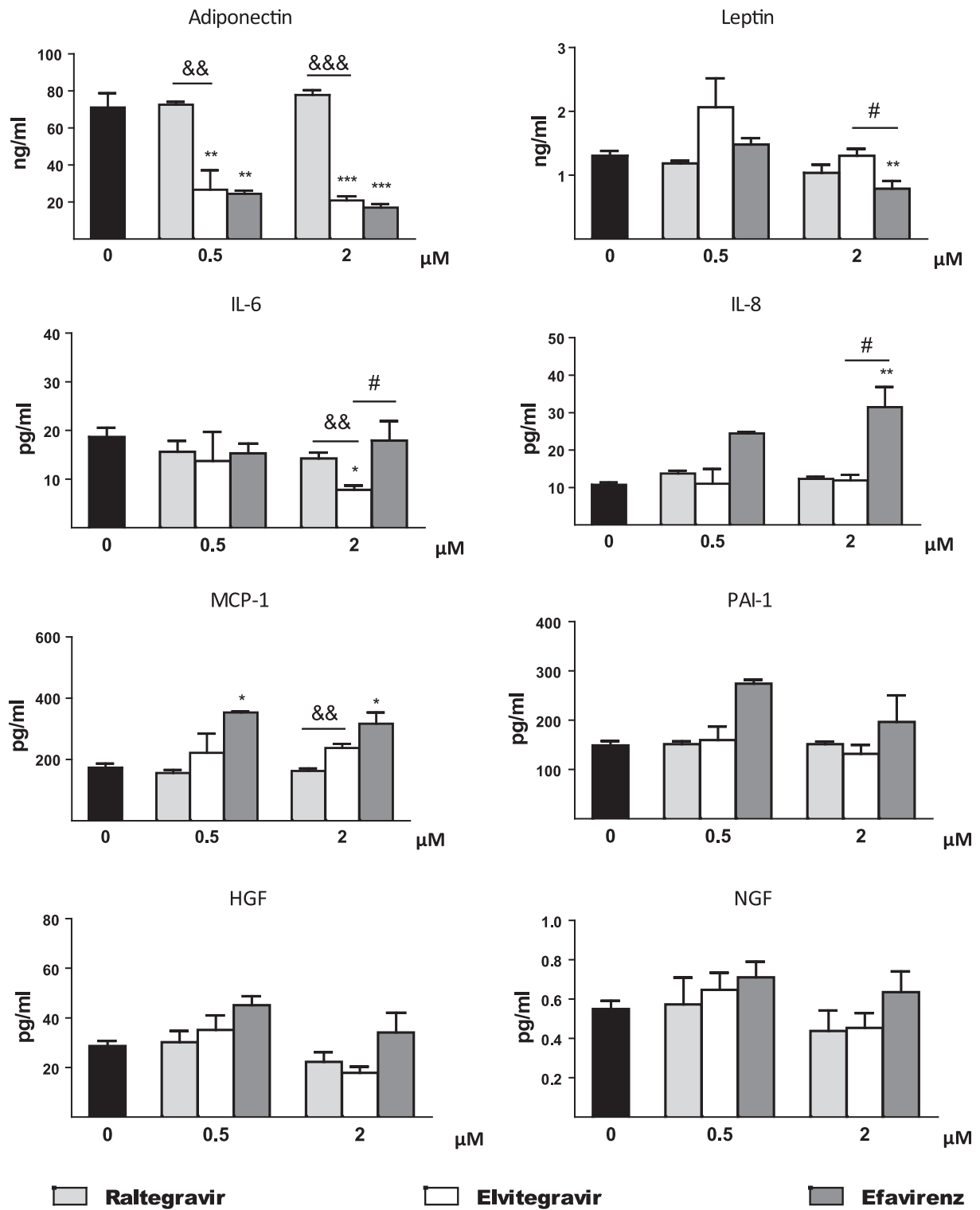


Fig. 3. Effects of elvitegravir on the release of adipokines and cytokines by SGBS human adipocytes in culture. SGBS human preadipocytes were differentiated in culture in the presence of the indicated concentrations of drugs. Values represent concentrations of adipokines and cytokines in the cell culture medium, presented as means \pm SEMs from 4 to 5 independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ for each drug treatment vs. control; # $P < 0.05$ for elvitegravir vs. efavirenz treatment at the same concentration.; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$ for elvitegravir vs. raltegravir treatment at the same concentration.

these drugs on systemic metabolism, and to some signs of healthier effects of elvitegravir on lipid profile relative to those of efavirenz (Sax et al., 2012). However, it is noteworthy that raltegravir, another HIV integrase inhibitor, did not show any deleterious effects on

adipogenesis, adipocyte-related gene expression or pro-inflammatory cytokines in human adipocytes, consistently with previous reports in rodent adipocyte cell models (Pérez-Matute et al., 2011; Minami et al., 2011).

The fact that the current study used an in vitro approach is an obvious limit with respect to the relevance of our findings for the treatment of patients. Elvitegravir plasma concentrations in patients administered clinical doses of the compound reach peak levels in the 5 μM range and show a C_{min} (minimum plasma concentration) of approximately 1 μM (Ramanathan et al., 2011). This indicates that the concentration range at which elvitegravir was found here to exert most of its deleterious effects in vitro may be reached in vivo. However, elvitegravir is highly protein bound, with a plasma-free fraction of approximately 1% (Ramanathan et al., 2011). In the present human adipocyte cell culture studies the drugs are added to serum-free adipocyte culture medium, –an inherent condition of this in vitro cell model–; thus, dose for dose, the effective concentration of elvitegravir in cell culture may be higher than the actual free elvitegravir concentration in blood, where serum proteins may bind substantial amounts of the drug. A similar consideration may be placed for efavirenz, which protein binding capacity is also as high as that for elvitegravir. On the other hand, in contrast with efavirenz, for which information on differential tissue distribution in patients is available (Dupin et al., 2002), to our knowledge there are no available data relating to the potential differential accumulation of elvitegravir (or raltegravir) in adipose tissue and blood.

In summary, this study suggests that elvitegravir, at moderate concentrations, would not likely exert profound deleterious effects on adipose tissue development or on the endocrine function of adipose tissue (adipokine and cytokine release) in treated patients, but totally neutral effects cannot be anticipated. Moreover, on the basis of this comparative study, the deleterious effects of elvitegravir are likely to be similar to those of efavirenz, but somewhat less intense, especially for the induction of pro-inflammatory signals. However, elvitegravir shows deleterious effects on human adipocytes that do not occur for raltegravir. It should be taken into account that the overall alterations in lipid metabolism in HIV-1-infected patients are thought to be caused not by a single drug but by the complex interactions of a given drug with other drug components of antiretroviral treatment regimens as well as underlying HIV-1-infection-related alterations. Thus, further studies assessing lipid abnormalities in patients treated with elvitegravir as a component of a drug cocktail will be necessary to confirm a metabolic-friendly effect of this integrase inhibitor and/or identify potential lipid alterations.

Funding information

This research was supported by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación (grant SAF2014-23636), Fondo de Investigaciones Sanitarias (grant PI14-00063), co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF); Red de Investigación en SIDA (RD06/006/0022), Instituto de Salud Carlos III, and an independent grant from Gilead. This company had no role in the study design, data collection, and interpretation of data or preparation of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.05.013>.

References

- Alessi, M.C., Poggi, M., Juhan-Vague, I., 2007. Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance. *Curr. Opin. Lipidol.* 18, 240–245.
- Bell, L.N., Cai, L., Johnstone, B.H., Traktuev, D.O., March, K.L., Considine, R.V., 2008. A central role for hepatocyte growth factor in adipose tissue angiogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294, E336–E344.

- Blanco, J.L., Whitlock, F., Milinkovic, A., Moyle, G., 2015. HIV integrase inhibitors: a new era in the treatment of HIV. *Expert. Opin. Pharmacother.* 16, 1313–1324.
- Bruun, J.M., Pedersen, S.B., Richelsen, B., 2000. Interleukin-8 production in human adipose tissue. Inhibitory effects of anti-diabetic compounds, the thiazolidinedione ciglitazone and the biguanide metformin. *Horm. Metab. Res.* 32, 537–541.
- Bruun, J.M., Pedersen, S.B., Richelsen, B., 2001. Regulation of interleukin 8 production and gene expression in human adipose tissue in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 1267–1273.
- Bulló, M., Peeraully, M.R., Trayhurn, P., Folch, J., Salas-Salvadó, J., 2007. Circulating nerve growth factor levels in relation to obesity and the metabolic syndrome in women. *Eur. J. Endocrinol.* 157, 303–310.
- Cohen, C., Elion, R., Ruane, P., Shamblaw, D., DeJesus, E., Rashbaum, B., Chuck, S.L., Yale, K., Liu, H.C., Warren, D.R., Ramanathan, S., Kearney, B.P., 2011. Randomized, phase 2 evaluation of two single-tablet regimens elvitegravir/cobicistat/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate versus efavirenz/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate for the initial treatment of HIV infection. *AIDS* 25, F7–F12.
- Díaz-Delfín, J., del Mar Gutiérrez, M., Gallego-Escuredo, J.M., Domingo, J.C., Gracia Mateo, M., Villarroya, F., Domingo, P., Giralt, M., 2011. Effects of nevirapine and efavirenz on human adipocyte differentiation, gene expression, and release of adipokines and cytokines. *Antivir. Res.* 91, 112–121.
- Díaz-Delfín, J., Domingo, P., Mateo, M.G., Gutiérrez Mdel, M., Domingo, J.C., Giralt, M., Villarroya, F., 2012. Effects of rilpivirine on human adipocyte differentiation, gene expression, and release of adipokines and cytokines. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 3369–3444.
- Dupin, N., Buffet, M., Marcelin, A.G., Lamotte, C., Gorin, I., Ait-Arkoub, Z., Tréluyer, J.M., Bui, P., Calvez, V., Peytavin, G., 2002. HIV and antiretroviral drug distribution in plasma and fat tissue of HIV-infected patients with lipodystrophy. *AIDS* 16, 2419–2424.
- El Hadri, K., Glorian, M., Monsempes, C., Dieudonné, M.N., Pecquery, R., Giudicelli, Y., Andreani, M., Dugail, I., Fève, B., 2004. In vitro suppression of the lipogenic pathway by the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz in 3T3 and human preadipocytes or adipocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 15130–15141.
- Gallego-Escuredo, J.M., Del Mar Gutierrez, M., Diaz-Delfin, J., Domingo, J.C., Mateo, M.G., Domingo, P., Giralt, M., Villarroya, F., 2010. Differential effects of efavirenz and lopinavir/ritonavir on human adipocyte differentiation, gene expression and release of adipokines and pro-inflammatory cytokines. *Curr. HIV Res.* 8, 545–598.
- Gazzard, B.G., et al., 2008. British HIV Association guidelines for the treatment of HIV-1-infected adults with antiretroviral therapy. *HIV Med.* 9, 563–608.
- Giralt, M., Domingo, P., Villarroya, F., 2011. Adipose tissue biology and HIV-infection. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25, 487–499.
- Hammer, S.M., et al., 2008. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society–U.S.A. panel. *JAMA* 300, 555–570.
- Haubruch, R.H., Riddler, S.A., DiRienzo, A.G., Komarow, L., Powderly, W.G., Klingman, K., Garren, K.W., Butcher, D.L., Rooney, J.F., Haas, D.W., Mellors, J.W., Havlir, D.V., AIDS Clinical Trials Group (ACTG) A5142 Study Team, 2009. Metabolic outcomes in a randomized trial of nucleoside, nonnucleoside and protease inhibitor-sparing regimens for initial HIV treatment. *AIDS* 23, 1109–1118.
- Lihn, A.S., Richelsen, B., Pedersen, S.B., Haugaard, S.B., Rathje, G.S., Madsbad, S., Andersen, O., 2003. Increased expression of TNF- α , IL-6, and IL-8 in HALS: implications for reduced adiponectin expression and plasma levels. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, E1072–E1152.
- Minami, R., Yamamoto, M., Takahama, S., Ando, H., Miyamura, T., Suematsu, E., 2011. Comparison of the influence of four classes of HIV antiretrovirals on adipogenic differentiation: the minimal effect of raltegravir and atazanavir. *J. Infect. Chemother.* 17, 183–188.
- Pérez-Matute, P., Pérez-Martínez, L., Blanco, J.R., Oteo, J.A., 2011. Neutral actions of Raltegravir on adipogenesis, glucose metabolism and lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Curr. HIV Res.* 9, 174–179.
- Pérez-Molina, J.A., Domingo, P., Martínez, E., Moreno, S., 2008. The role of efavirenz compared with protease inhibitors in the body fat changes associated with highly active antiretroviral therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 234–279.
- Ramanathan, S., Mathias, A.A., German, P., Kearney, B.P., 2011. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of the HIV integrase inhibitor elvitegravir. *Clin. Pharmacokinet.* 50, 229–273.
- Riddler, S.A., Haubruch, R., DiRienzo, A.G., Peeples, L., Powderly, W.G., Klingman, K.L., Garren, K.W., George, T., Rooney, J.F., Brizz, B., Laloo, U.G., Murphy, R.L., Swindells, S., Havlir, D., Mellors, J.W., AIDS Clinical Trials Group Study A5142 Team, 2008. Class-sparing regimens for initial treatment of HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* 358, 2095–2106.
- Rockstroh, J.K., DeJesus, E., Henry, K., Molina, J.M., Gathe, J., Ramanathan, S., Wei, X., Plummer, A., Abram, M., Cheng, A.K., Fordyce, M.W., Szwarcberg, J., GS-236-0103 Study Team, 2013. A randomized, double-blind comparison of coformulated elvitegravir/cobicistat/emtricitabine/tenofovir DF vs ritonavir-boosted atazanavir plus coformulated emtricitabine and tenofovir DF for initial treatment of HIV-1 infection: analysis of week 96 results. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 62, 483–489.
- Sax, P.E., DeJesus, E., Mills, A., Zolopa, A., Cohen, C., Wohl, D., Gallant, J.E., Liu, H.C., Zhong, L., Yale, K., White, K., Kearney, B.P., Szwarcberg, J., Quirk, E., Cheng, A.K., GS-US-236-0102 study team, 2012. Co-formulated elvitegravir, cobicistat, emtricitabine, and tenofovir versus co-formulated efavirenz, emtricitabine, and tenofovir for initial treatment of HIV-1 infection: a randomised, double-blind,

- phase 3 trial, analysis of results after 48 weeks. *Lancet* 379, 2439–2487.
- Schlüter, A., Yubero, P., Iglesias, R., Giral, M., Villarroya, F., 2002. The chlorophyll-derived metabolite phytanic acid induces white adipocyte differentiation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26, 277–280.
- Stray, K.M., Bam, R.A., Birkus, G., Haom, J., Lepistm, E.I., Yant, S.R., Ray, A.S., Cihlar, T., 2013. Evaluation of the effect of cobicistat on the in vitro renal transport and cytotoxicity potential of tenofovir. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 57, 4982–4991.
- Wabitsch, M., Brenner, R.E., Melzner, I., Braun, M., Möller, P., Heinze, E., Debatin, K.M., Hauner, H., 2001. Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25, 8–15.

1	Supplemental Table 1. TaqMan probes used for quantitative real-time PCR
2	
3	
4	Cytochrome c oxidase subunit IV (COX4I1), Hs00266371;
5	CCAAT-enhancer binding protein- α (C/EBP α), Hs00269972;
6	Cytochrome b, Hs02596867;
7	Lipoprotein lipase (LPL), Hs00173425;
8	Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ), Hs00231674;
9	Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), Hs00234140;
10	Interleukin-6 (IL-6), Hs00174131;
11	Interleukin-8 (IL-8), Hs00174103;
12	Glucose transporter GLUT4, Hs00168966;
13	Adiponectin, Hs00605917;
14	Leptin, Hs00174877;
15	18S rRNA, Hs99999901;

16 **Supplemental Table 2. Cytotoxic effects of elvitegravir on SGBS human pre-adipocytes.**

17

18 Drug concentration (μM)

19

	0.1	0.5	1	2	5
20					
21					
22 Elvitegravir	2.1 ± 3.0	2.6 ± 2.2.	0.9 ± 0.6	0.4 ± 0.6	-2.1 ± 2.4
23					
24 Efavirenz	0.5 ± 3.6	3.4 ± 2.8	0.4 ± 2.4	2.6 ± 1.2	-1.3 ± 2.4
25					
26 Raltegravir	0.4 ± 1.4	1.8 ± 3.9	0.7 ± 1.8	0.3 ± 2.5	0.1 ± 1.9
27					

28 Data are expressed as mean ± SEM of the percent cytotoxicity (LDH activity in the cell
29 culture medium) relative to the 100% cytotoxicity control (LDH activity after total lysis of
30 cells). None of the results was significantly different from zero.

31
32
33
34

Supplemental Table 3. Effects of elvitegravir on mitochondrial DNA levels in SGBS human pre-adipocytes.

Drug concentration (μM)		
	2	5
Elvitegravir	0.8 ± 0.3	1.2 ± 0.4.
Efavirenz	0.9 ± 0.3	0.8 ± 0.4
Raltegravir	1.3 ± 0.2	0.8 ± 0.2

Data are expressed as mean ± SEM of fold-change in mitochondrial DNA/nuclear DNA ratio levels relative to control levels set to 1 (1.0 ± 0.3) for four independent cell culture assays. None of the results was significantly different from the controls.

Effects of antiretroviral drugs used in HIV infection on the fibroblast growth factor-21/ β -Klotho system

Revista: Antiviral Research

PMID: [Enviado]

Título: *Efectos de los fármacos antirretrovirales utilizados en la infección por VIH sobre el sistema fibroblast growth factor-21/ β -Klotho.*

Resumen: Los pacientes infectados por el VIH que siguen la terapia antirretroviral experimentan diferentes alteraciones metabólicas, incluyendo un aumento en los niveles circulantes de la hormona antidiabética *fibroblast growth factor-21* (FGF21) y una disminución en los niveles de su correceptor β -Klotho (KLB) en sus tejidos diana. Esta situación es comparable al estado de resistencia a FGF21 que se observa en la obesidad y la diabetes tipo II. En este trabajo hemos desarrollado el primer estudio sistemático sobre el efecto de las diferentes familias de fármacos antirretrovirales sobre el sistema FGF21/KLB en células humanas de hígado, tejido adiposo y músculo esquelético. También exploramos el posible papel de la inducción de las rutas de estrés de retículo y de estrés oxidativo promovida por estos fármacos sobre la desregulación del sistema FGF21/KLB. De entre los diferentes antirretrovirales probados, el inhibidor de la transcriptasa reversa no análogo de nucleósido efavirenz y la mayor parte de los inhibidores de la proteasa vírica indujeron la expresión de FGF21 en hepatocitos, adipocitos y células musculares humanas en cultivo. Ni el inhibidor de entrada maraviroc ni los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos tuvieron efecto alguno. De entre los inhibidores de la integrasa vírica, el elvitegravir produjo un aumento en la expresión de FGF21, mientras que el raltegravir no tuvo ningún efecto. En hepatocitos y adipocitos humanos, células que son dianas de la acción de FGF21, los fármacos lopinavir/ritonavir, efavirenz

y elvitegravir tuvieron un efecto represor sobre la expresión génica de KLB. Además se observó que los fármacos que desregulaban el sistema FGF21/KLB también activaban las rutas de estrés de retículo y de estrés oxidativo, presentando efectos paralelos a los producidos por los inductores de estrés de retículo tunicamicina y thapsigargina. Teniendo en cuenta los potenciales efectos adversos sobre el metabolismo, el sistema cardiovascular y la homeostasis del hueso asociados a altos niveles de FGF21, consideramos que este estudio *in vitro* debe de ser tenido en cuenta para manejar y evitar posibles efectos secundarios y comorbilidades en pacientes que siguen el tratamiento antirretroviral.

Effects of antiretroviral drugs used in HIV infection on the fibroblast growth factor-21/ β -Klotho system

Ricardo Moure^{a,b}, Pere Domingo^{c,d}, Laura Gasa^a, Joan Villarroya^{a,d,e}, José M. Gallego-Escuredo^c, Tania Quesada-López^{a,b}, Joan C Domingo^a, Francesc Villarroya^{a,b}, Marta Giral^{a,b*}

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biomedicine, and Institut de Biomedicina (IBUB), University of Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain.

^bCIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Spain.

^cInstitut de Recerca Biomèdica (IRB) de Lleida, Lleida, Spain; Department of Infectious Diseases, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain; Department of Infectious Diseases, Hospital Universitari de Santa Maria, Lleida, Spain; Universitat de Lleida, Lleida, Catalonia, Spain.

^dRed de Investigación en SIDA (RIS), Spain.

^eInfectious Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain.

Running title: Effects of antiretroviral drugs on FGF21

Keywords: antiretroviral drug, FGF21, β -Klotho, ER stress, hepatocyte, adipocyte

*To whom correspondence should be addressed:

Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular, Facultat de Biologia,
Universitat de Barcelona

Av. Diagonal 643, E-08028-Barcelona, Catalonia, Spain

Tel: 34-93-4034613,

Fax: 34-93-4021559,

E-mail: mgiralt@ub.edu

ABSTRACT

HIV-infected patients following antiretroviral therapy develop several metabolic disturbances, including an increase in the circulating levels of the antidiabetic hormone fibroblast growth factor-21 (FGF21) and a decrease in its mandatory co-receptor β -Klotho (KLB) in target tissues. This situation is comparable to the FGF21 resistance status observed in obesity and type 2 diabetes. We performed the first systematic study of the effect of members of the different antiretroviral drug families on the FGF21/KLB system in human hepatic, adipose and skeletal muscle cells. We also explored the possible role of endoplasmic reticulum (ER) stress and oxidative stress (elicited by these drugs) in the deregulation of the FGF21/KLB system. Among the antiretroviral drugs tested, the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz and most protease inhibitors induced FGF21 gene expression in human hepatic, adipose and muscle cells. Neither nucleoside reverse transcriptase inhibitors nor the entry inhibitor maraviroc had any effect. For integrase inhibitors, elvitegravir significantly induced FGF21 expression whereas raltegravir had minor effects only in adipose cells. In human hepatocytes and adipocytes, known target cells of FGF21 action, lopinavir/ritonavir, efavirenz, and elvitegravir had an inhibitory effect on KLB gene expression. Moreover, drug treatments eliciting such response (FGF21 induction and KLB repression) were those found to induce ER stress and oxidative stress; parallel effects of the pharmacological inducers of these stress pathways (thapsigargin and tunicamycin), were also observed. Moreover, pharmacological inhibitors of either ER stress or oxidative stress significantly impaired lopinavir/ritonavir regulation of FGF21, but not KLB. Considering the potential metabolic, cardiovascular and bone-related adverse effects of disturbed FGF21/KLB system, it could be important to address the relevance of the current *in vitro* study in the management of co-morbidities resulting from specific components of antiretroviral treatment of HIV-infected patients

1. INTRODUCTION

The success in the treatment of HIV-infected patients with antiretroviral therapies (ART) has transformed HIV infection mostly in a chronic medical condition (Deeks et al., 2013). ART patterns can achieve a strong virological control but long-term exposure to ART, often in a growing older population of HIV patients, results in enhanced metabolic complications (Lagathu et al., 2017). Insulin resistance and metabolic syndrome, enhanced cardiovascular risk and, even overt lipodystrophy are common alterations in ART-treated, HIV-infected patients (Caron-Debarle et al., 2010). Several classes of antiretroviral drugs appear especially involved in eliciting these alterations. Thus, nucleoside analogs such as zidovudine or stavudine, inhibiting reverse transcriptase, appear to be specially damaging for lipodystrophy whereas protease inhibitors (PIs) have been implicated on altered glucose homeostasis (Giralt et al., 2011). The molecular mechanisms accounting for these toxicities are not totally known. Recently developed drugs, either novel members of the existing classes of drugs (new reverse transcriptase inhibitors or new PIs) or drugs addressed to new targets (integrase inhibitors, entry inhibitors) appear less prone to elicit overt lipodystrophy, but their impact on metabolic homeostasis in patients is still unclear (Srinivasa and Grinspoon, 2014).

Several studies in distinct cohorts of HIV patients have been coincident to report an altered FGF21 endocrine system, characterized by abnormally high levels of FGF21 (Domingo et al., 2010; Lindegaard et al., 2013; Srinivasa et al., 2015). FGF21 is a hormonal factor recently found to play a key role in glucose and lipid homeostasis, acting as an anti-diabetic and possibly anti-obesity factor (Giralt et al., 2015). Several recent pilot studies have reported improvements of lipidemia and body weight after short-term treatment of obese/diabetic volunteers with FGF21 analogs (Gaich et al., 2013; Talukdar et al., 2016). Long-acting FGF21 analogs and agonist mimicking FGF21 action are currently investigated in clinical trials in patients with obesity and diabetes (NCT02413372, NCT02538874, NCT2593331, NCT02708576, NCT03060538). FGF21 is mainly produced in liver and targets adipose tissue (and possibly liver as well) promoting glucose uptake and oxidation (Markan et al., 2014). The paradoxically high FGF21 levels in HIV patients are associated with a down regulation of molecular mediators of cellular

FGF21 action, namely β -Klotho (KLB), the cell surface co-receptor of FGF receptors (FGFRs) which is essential for FGF21 action in target tissues (Gallego-Escuredo et al., 2012). This scenario, reminiscent of "FGF21 resistance", is equal to that found in obesity and type II diabetes (Fisher et al., 2010; Gallego-Escuredo et al., 2015). It has been claimed that altered FGF21 endocrine system, involving liver and adipose tissue, could be a major mechanism eliciting metabolic alterations in HIV patients (Gallego-Escuredo et al., 2012; Miehle et al., 2016; Srinivasa et al., 2015). Moreover, skeletal muscle, a tissue not expressing significant amounts of FGF21 in healthy conditions, show increased expression of FGF21 when muscle experiences mitochondrial oxidative stress (Ji et al., 2015; Miehle et al., 2016; Suomalainen, 2013); and a recent study has reported enhanced expression of FGF21 in muscle from HIV patients, in association with metabolic alterations (Lindegård et al., 2013).

The previous studies in distinct HIV patient cohorts have failed to show significant associations between abnormally high FGF21 levels and specific drugs included in the ART cocktails, possibly due to the limited number of patients and high diversity in the ART profiles of treatment at the time of the study and previously. However, several processes such as endoplasmic reticulum (ER) stress or oxidative stress are known to induce hepatic expression of FGF21 (Ribas et al., 2014; Schaap et al., 2013; Wan et al., 2014) and there are reports indicating that several antiretroviral drugs (e.g. PIs and efavirenz) promote such processes (Apostolova et al., 2013; Borsa et al., 2015; Zha et al., 2013). Inflammation in adipose tissue, a common condition in obesity, diabetes and HIV lipodystrophy, causes down-regulation of KLB (Díaz-Delfín et al., 2012b).

Studies on the effects of antiretroviral drugs on human cells in culture have proven to be useful for initial *in vitro* assessment of the potential of drugs to disturb metabolism (Auclair et al., 2014; Capel et al., 2012; Caron et al., 2008; Diaz-Delfin et al., 2013; Díaz-Delfín et al., 2012a, 2011; Gallego-Escuredo et al., 2010; Lagathu et al., 2007; Moure et al., 2016). These studies have reported the effects of several antiretroviral drugs on adipogenesis, senescence, mitochondrial toxicity and ER stress, but none has checked previously their action on the FGF21 system. Here we report a systematic analysis of the capacity of antiretroviral drugs, both "classical" and recently developed, for their action

promoting FGF21 expression and KLB down-regulation, the two key events associated with disturbed FGF21 system in patients, in human hepatic, adipose and muscle cells. The role of ER stress and oxidative stress elicited by drugs on these alterations are also explored.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Reagents

The following chemicals/drugs were used: zidovudine (AZT) (GlaxoSmithKline), stavudine (D4T) (Bristol-Myers Squibb), tenofovir disoproxil fumarate (TDF) (Gilead Sciences), nevirapine (NVP) (Boehringer Ingelheim), efavirenz (EFV) (Bristol-Myers Squibb), rilpivirine (RPV) (Janssen Pharmaceuticals, Inc.), ritonavir (RTV) (Abbott Laboratories), lopinavir (LPV) (Abbott Laboratories), nelfinavir (NFV) (Agouron), atazanavir (ATV) (Bristol-Myers Squibb), raltegravir (RAL) (sc-364600, Santa Cruz), elvitegravir (ELV) (Gilead Sciences), maraviroc (MRV) (Pfizer), tunicamycin (TUN) (T7765, Sigma-Aldrich), thapsigargin (THAP) (T9033, Sigma-Aldrich), 4-Phenylbutyric acid (PBA) (P21005, Sigma-Aldrich), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (TROLOX) (648471, Calbiochem), rosiglitazone (ALX-350-125, Alexis Biochemicals). Reagents for cell cultures were from Sigma-Aldrich. For initial assessment of the effects of antiretroviral drugs prior to dose-response analysis, concentrations in the highest range not causing cytotoxicity in the distinct cell systems were employed. Drugs were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and equal amounts of solvent ($\leq 0.1\%$) were added to Control cells.

2.2. Cell culture

For studies on hepatic cells, HepG2 cells were cultured in DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS). For studies on adipocytes, human SGBS adipocytes were used (Wabitsch et al., 2001). Cells were cultured and differentiated to adipocytes as already reported (Moure et al., 2016). Basically, SGBS pre-adipocytes were maintained in DMEM/F12 containing 10% FBS. After cells had

become confluent, adipogenic differentiation was initiated by first incubating cells for 6 days in serum-free medium containing 20 nM insulin, 0.2 nM triiodothyronine (T3) and 100 nM cortisol, supplemented with 25 nM dexamethasone, 500 μ M 3-isobutyl-methyl-xantine. Subsequently, the cells were switched to adipogenic differentiation medium (containing insulin, T3, and cortisol only) and maintained for up to 10 days, when more than 90% cells have acquired differentiated adipocyte morphology (lipid droplet accumulation). Depending on the experimental design, cells were treated with drugs across the differentiation process (the 10 days of differentiation), or acutely (24h) once the cells have been differentiated. For studies in human skeletal muscle cells, LHCN-M2 myoblastic cells were differentiated to myotubes as previously reported (Ribas et al., 2014). Basically, myoblastic LHCN-M2 cells were cultured in DMEM/Medium 199 containing 15% FBS and supplemented with 60 μ g/ml ZnSO₄, 14 μ g/ml vitamin B12, 55 μ g/ml dexamethasone, 30 μ g/ml human hepatocyte growth factor and 10 μ g/ml basic FGF. When cells reached around 80% confluence, culture medium was replaced by DMEM/Medium 199 supplemented with 0.5% FBS, 1mg/ml insulin, 10 mg/ml apo-transferrin, 55 μ g/ml dexamethasone. After two days of culture, media was replaced with DMEM/Medium 199 supplemented with 55 μ g/ml dexamethasone and cells were further cultured for 10 days, when more than 90% have acquired a myotube differentiated phenotype on the basis of morphology (multinucleated fused fiber appearance). LHCN-M2 myotubes were exposed to drugs for 24h.

2.3. RNA isolation, reverse transcription and real time quantitative PCR (qPCR)

Total RNA was extracted from cells using an affinity column-based method (Machery-Nagel). Reverse transcription was performed in 20 μ l, using random hexamer primers (Applied Biosystems) and 0.5 μ g total RNA. Polymerase chain reactions (PCR) were conducted in an ABI/Prism 7700 Sequence Detector System using 25 μ l of reaction mixture containing 1 μ l of cDNA, 12.5 μ l of TaqMan Universal PCR Master Mix, 250 nM probes and 900 nM primers from Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix (TaqMan; Applied Biosystems). The

following Assay-on-Demand probes from LifeTechnologies were used: FGF21 (Hs00173927), KLB (Hs00545621), CHOP10 (Hs99999172), HSPA5 (Hs99999174), HPRT (Hs99999909), RPLP0 (Hs99999902) and 18S rRNA, Hs99999901. Controls with no RNA, primers, or reverse transcriptase were included in each set of experiments. Each sample was run in duplicate. The mean value of the duplicates was calculated using the comparative ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method following the manufacturer's instructions. Each mean value was normalized with respect to that of the reference control gene (HPRT mRNA) and used to calculate the relative amount of individual mRNAs. Parallel calculations were performed using other different reference control genes (RPLP0 mRNA and 18S rRNA) and results were essentially the same.

2.4. Plasmid constructions and dual-luciferase reporter assays

For studies on the transcriptional activity of FGF21 and KLB genes, HepG2 hepatic cells and HIB1B adipogenic cells were transiently transfected (respectively) using Lipofectamine (Invitrogen) at 50% confluence in a 24-well plate. The reporter plasmid -1497-FGF21-Luc, containing a DNA fragment corresponding to positions -1497 to +5 in the 5' region of the mouse FGF21 gene linked to the firefly luciferase gene, and the -77-FGF21-Luc mutant construct containing only the -77/+5 region of the FGF21 gene, have been reported previously (Hondares et al., 2011). The reporter plasmid driven by the KLB gene promoter contained a DNA fragment corresponding to positions -1055 to +45 and was obtained from SwitchGear Genomics. Cells were also co-transfected with a pRL-CMV expression vector for Renilla luciferase (Promega). Each transfection condition was assayed in triplicate. Cells were incubated for 48 h after transfection and then incubated with or without drugs, as indicated in the text, for an additional 24 h before harvesting. Luciferase activities were measured in a Glomax 96Microplate Luminometer using the Dual Luciferase Reporter assay system kit (Promega). Luciferase activities driven by promoter constructs were normalized to that of Renilla luciferase as a control for variation in transfection efficiency.

2.5. Statistical analysis

In the studies comparing high concentrations of different drugs, statistical analyses were performed using Student's t-test comparing the effect of each drug with the control. In the case of dose response studies, statistical analyses were performed using one-way Anova followed by Dunnett's test. Differences with P-values <0.05 were considered statistically significant.

3. RESULTS

3.1. Effects of antiretroviral drugs on FGF21 and KLB expression in human hepatic cells.

In order to determine the putative effects of antiretroviral drugs on the FGF21 system, first we analyzed human hepatocytes, the main cellular source of FGF21 and potential cellular target of the FGF21 action as well. Among the antiretroviral drugs tested in hepatic cells, all the PIs (including the lopinavir/ritonavir 4:1 combination) elicited a robust induction of FGF21 expression (Fig 1). Neither classical nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs, zidovudine, stavudine) nor the nucleotide-analog tenofovir altered FGF21 gene expression. Among non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), efavirenz induced markedly FGF21 expression, whereas neither nevirapine nor rilpivirine showed significant effects. For integrase inhibitors (INSTIs), elvitegravir induced significantly FGF21 expression whereas raltegravir had no effect. The entry inhibitor (EI) maraviroc had no effect either. The parallel assessment of the effects of the drugs on KLB expression evidenced a reciprocal pattern of alterations: most antiretrovirals inducing FGF21 (most PIs, efavirenz, elvitegravir) caused a repression in KLB expression. Accordingly, KLB expression was unaltered in response to drugs that did not alter FGF21 expression.

The FGF21 induction and KLB repression found in response to PIs and efavirenz, drugs known to induce ER stress and oxidative stress in several cell types including hepatocytes (Borsa et al., 2015; Zha et al., 2013), prompted us to examine whether these drugs also altered CHOP10 and HSPA5 expression, marker genes of responsiveness to ER stress and/or oxidative stress (Song et

al., 2008; Wang and Kaufman, 2012). Results indicated a remarkable parallelism between the effects of drugs on CHOP10 and HSPA5 gene expression, and effects on FGF21 gene expression, as both genes were significantly up-regulated in response to PIs, efavirenz and elvitegravir (Fig 1). The same occurred for KLB down regulation. In addition, HepG2 cells were treated with two known inducers of ER stress, tunicamycin and thapsigargin, which, effectively, strongly induced CHOP10 and HSPA5 expression. Both drugs elicited a robust reciprocal effect on FGF21 expression (induction) and KLB expression (repression), as the aforementioned antiretroviral drugs did (Fig 1).

After this first screening on the effects of several drugs, we determined the dose-response effects of drugs which had been found to alter the FGF21 system at a single, relatively high dose, in the study above (Fig 2), and raltegravir used as control for non-affecting drug. Efavirenz, elvitegravir and the lopinavir/ritonavir combination caused a reciprocal dose-response effect, eliciting FGF21 induction and KLB repression. Results indicated also a dose-response induction in the expression of CHOP10 and HSPA5 for the three drugs, similar to that found for FGF21 induction and KLB repression, with the exception of efavirenz. Efavirenz only induced the markers of ER stress/oxidative stress at the highest concentration tested (50 μ M), despite lower concentrations (20 μ M) were sufficient to alter FGF21 and KLB expression. Raltegravir did not alter either FGF21 or KLB gene expression, or CHOP10 or HSPA5 expression at any concentration tested.

The transcriptional activity of the FGF21 gene promoter was assayed via transfection of a plasmid construct in which luciferase activity is driven by the 5' region (1.5 kb) of the FGF21 gene (Fig 3). Data indicated that the positive control of ER stress induction thapsigargin and the drugs efavirenz and lopinavir/ritonavir caused a significant induction of the FGF21 promoter activity; this effect was lost when transfection was performed using a construct deleted for most of the 5' non-coding region of the FGF21 gene (-77 bp). These results demonstrated that ER stress-inducing drugs and antiretroviral drugs eliciting increased FGF21 mRNA expression act through the activation of FGF21 gene transcription.

3.2. Effects of antiretroviral drugs on FGF21 and KLB expression in human adipocytes.

Next, we analyzed the effects of antiretroviral drugs on adipocytes, the main cellular target of FGF21. Human SGBS adipocytes were exposed to the panel of antiretroviral drugs of distinct classes across their adipogenic differentiation. As for hepatic cells, for this first screening, drugs were used at a concentration range known to be non-cytotoxic in this cell type, and FGF21 and KLB gene expression was determined. In control conditions, SGBS adipocytes expressed very low levels of FGF21, in agreement with the almost undetectable expression of FGF21 in human adipose tissue (Dushay et al., 2010; Gallego-Escuredo et al., 2012; Hondares et al., 2014). However, results indicated that the NNRTI efavirenz and the INSTIs elvitegravir and, to a minor extent, raltegravir and lopinavir/ritonavir ($P=0.08$), induced FGF21 gene expression (Fig 4). A reciprocal effect of repression of the KLB gene was found for these drugs. As for hepatic cells, the expression of the ER stress/oxidative stress markers CHOP10 and HSPA5 paralleled the effects found for FGF21 expression in response to drugs, with the exception of the HSPA5 unresponsiveness to elvitegravir. Dose-response analysis of the effects of drugs that showed significant effects at single concentrations indicated that efavirenz caused an overt reciprocal FGF21 induction/KLB repression effect at 5 μM , lopinavir/ritonavir at 20 μM , and elvitegravir at the 1-2 μM range (Fig 5). The effects found for the three types of drug treatments were remarkable parallel to the dose-response of inductive effects observed for CHOP10. However, the ER stress marker HSPA5 was only induced in response to lopinavir/ritonavir

Considering that treatment of adipocytes with drugs throughout adipogenic differentiation may result in effects secondary to alterations in the overall differentiation process, a second experimental setting was undertaken by exposing already differentiated human adipocytes to the drugs for 24h (Fig 6). Results were highly similar to those found previously in adipogenic cells chronically treated with drugs: very low basal expression of FGF21, strong FGF21 induction and KLB repression in response to lopinavir/ritonavir and elvitegravir. We also found that the ER stress/oxidative stress markers CHOP10 and HSPA5 were induced by the same drugs that induced FGF21 expression and KLB

repression, with the exception of lack of effect of elvitegravir on HSPA5. The ER stress inducers thapsigargin and tunicamycin mimicked the FGF21 induction and KLB repression elicited by the drugs. It is worth mentioning that, in this experimental setting, rilpivirine caused a significant induction of CHOP10 and HSPA5 expression, but this was not translated into changes in FGF21 or KB gene expression. As above, a dose response analysis was performed and indicated that only high concentrations of efavirenz, lopinavir/ritonavir, and elvitegravir (10-20 μ M range) caused minor effects on FGF21 expression, in parallel with CHOP10 and HSPA5 expression (Fig 7).

Considering that the KLB gene is particularly sensitive to the differentiation status of adipocytes, we investigated whether the repression of KLB mRNA levels in response to drugs could be due to impaired KLB gene transcription. We transfected pre-adipocytes with a luciferase reporter plasmid driven by the KLB gene promoter and exposed cells to drugs. Results indicated that, whereas rosiglitazone (used as positive control of KLB gene regulation) (Díaz-Delfín et al., 2012b; Wang et al., 2008) induced KLB gene transcription, lopinavir/ritonavir and efavirenz significantly down-regulated KLB promoter activity, as positive controls of ER stress tunicamycin and thapsigargin also did (Fig 8).

3.3. Effects of antiretroviral drugs on FGF21 expression in human skeletal muscle cells.

Although skeletal muscle is considered not to be either a source or target of FGF21, a recent report indicates enhanced FGF21 expression in muscle from HIV patients (Lindegård et al., 2013), a phenomenon also reported in other conditions of skeletal muscle stress such as mitochondrial diseases (Ji et al., 2015; Suomalainen, 2013). Effectively, KLB expression was undetectable in human differentiated LHCN-M2 skeletal muscle cells, as expected. FGF21 expression was also very low in control conditions but PIs (with the exception of atazanavir) and efavirenz caused a dramatic induction of FGF21 expression, whether neither NRTIs nor NNRTIs other than efavirenz, nor maraviroc, had any effect (Fig 9). The same PIs causing FGF21 up-regulation, induced the

expression of CHOP10 and HSPA5. Thapsigargin and tunicamycin induced FGF21 expression in muscle cells, also.

3.4. Effects of inhibitors of ER stress and oxidative stress on the action of antiretroviral drugs on FGF21 and KLB gene expression in human adipocytes.

Previous data strongly suggested that ER stress and oxidative stress are determining a reciprocal alteration in the FGF21 system based on induction of FGF21 expression and repression of KLB expression, and several antiretroviral drugs, mainly PIs such as lopinavir/ritonavir and efavirenz, acted in this same way on cells. We used PBA, an inhibitor of ER stress, and Trolox, a vitamin E-analog antioxidant, in order to ascertain the involvement of the aforementioned stress pathways in antiretroviral drug effects on the FGF21/KLB system (Fig. 10).

PBA impaired significantly the induction of CHOP10 and HSPA5 by thapsigargin, thus validating this approach to blunt ER stress. Trolox reduced thapsigargin-mediated CHOP10 induction but not thapsigargin-mediated HSPA5 induction, thus indicating the exclusiveness of HSPA5 as ER stress marker, in contrast with the dual responsiveness of CHOP10 to both ER- and oxidative-stress. PBA suppressed the induction of FGF21 and the repression of KLB gene expression by thapsigargin, thus confirming the capacity of ER stress to cause FGF21 and KLB up- and down-regulation, respectively. The induction of CHOP10 and HSPA5 by lopinavir/ritonavir was impaired by both PBA and Trolox, suggesting the capacity of PIs to cause both ER- and oxidative-stress. Similarly, PBA suppressed the induction of FGF21 by lopinavir/ritonavir and Trolox reduced it significantly. However, the repression of KLB expression by lopinavir/ritonavir was unaffected by PBA or Trolox, which indicates that pathways other than ER-stress/oxidative stress may be specifically involved in KLB down-regulation in response to PIs. In these conditions of treatment of adipocytes by efavirenz, effects were relatively moderate, although a significant induction of CHOP10 and HSPA5 was also found. Minor effects were observed in the presence of PBA or Trolox. The minor induction of FGF21 by efavirenz was somewhat reduced by PBA and Trolox.

Collectively, these data indicate that PIs and also efavirenz induce FGF21 expression through mechanisms involving ER- and oxidative-stress. However, despite KLB repression may be elicited in response to ER-stress, other pathways of action are likely to be also involved in the action of PIs repressing KLB expression.

4. DISCUSSION

Present studies indicate that antiretroviral drugs from distinct families alter the expression of FGF21 and the FGF21 co-receptor KLB in cells in the same sense that alterations observed in HIV patients under antiretroviral treatment: they induce abnormally high FGF21 levels and repress KLB expression (Domingo et al., 2010; Gallego-Escuredo et al., 2012; Lindegaard et al., 2013). The co-receptor KLB is essential for FGF21 activity and thus, cells lacking KLB are unable to respond to FGF21 (Kurosu et al., 2007). The expression of KLB and, to a minor extent that of FGF receptor-1 (FGFR1), the main mediators of endocrine FGF responsiveness in adipose tissue, was reported to be reduced in abdominal fat biopsies from HIV-infected patients, either under antiretroviral treatment or not, relative to healthy non-infected controls (Gallego-Escuredo et al., 2012). In the present study, the expression of FGFRs in target cells, i.e., FGFR1 in human adipocytes or FGFR4 in human hepatocytes, was found to be essentially unaltered (data not shown), pointing to KLB as the main target of antiretroviral drug toxicity. Moreover, alterations are systematically reciprocal: those drugs (and drug concentrations) inducing FGF21 expression are mostly the same eliciting the repression in KLB expression. NRTIs, and the entry inhibitor maraviroc, were systematically neutral upon the FGF21/KLB system. PIs, the NNRTI efavirenz and the INSTI elvitegravir were the drugs most active in eliciting the FGF21 induction/KLB repression effects which, otherwise, occurred at somewhat distinct extent according to the drug and cell type assayed. Induction of FGF21 and repression of KLB transcript levels occurred through effects on gene transcription in hepatic and adipose cells, respectively.

In general, the drug treatments of human hepatic, adipose and muscle cells eliciting the FGF21 induction/KLB repression response were also those inducing

ER stress/oxidative stress, as evidenced by the effects of pharmacological inducers of these stress pathways. Induction of ER stress/oxidative stress occurred in a close parallelism with FGF21 induction and KLB repression in the dose response assays for lopinavir/ritonavir and elvitegravir, supporting the role of these stress pathways in mediating the FGF21 induction/KLB repression response. However, elvitegravir induced FGF21 and repressed KLB at concentrations lower than those eliciting overt ER stress in hepatic cells, thus suggesting that pathways other than ER stress may be additionally involved in elvitegravir effects.

The concordance between the alterations in the FGF21/KLB system found in HIV patients, and the effects found here for several antiretroviral drugs on human cells is remarkable, and suggest that attention should be placed in relation to the potential side-effects of these drugs as potentially disturbing the FGF21 system. Abnormally high FGF21 levels have been considered a marker of disturbed metabolism in non-HIV-infected patients with obesity, diabetes and congenital lipodystrophy (Gallego-Escuredo et al., 2015; Miehle et al., 2016; Zhang et al., 2008), whereas KLB repression has been associated with impairment of the glucose uptake and of other healthy effects that are mediated by FGF21 (Díaz-Delfín et al., 2012b). Studies in distinct HIV patient cohorts have been concordant in reporting that elevated FGF21 levels are associated with indications of insulin resistance, such as HOMA-IR, insulinemia and glycemia (Domingo et al., 2010; Lindegaard et al., 2013; Miehle et al., 2016; Srinivasa et al., 2015). Lifestyle interventions in HIV patients achieving metabolic improvement was associated with a decline in FGF21 levels which correlated with indications of improved energy metabolism (Srinivasa et al., 2015).

The multiple cohorts of patients in which FGF21 levels have been determined and allowed to recognize abnormally elevated FGF21 levels were composed of patients treated with PIs and/or other drugs that are found here to increase FGF21 expression in cells (Domingo et al., 2010; Gallego-Escuredo et al., 2012; Lindegaard et al., 2013; Miehle et al., 2016; Srinivasa et al., 2015). It would be of interest to develop further studies in HIV patients that had been treated only with drugs “neutral” for FGF21 induction/KLB repression in our cell-based study in

order to assess whether they are protected against this alteration and concomitant metabolic disturbances

The present study has obvious limitations in relation to the translation of the *in vitro* data to considerations on the impact on the FGF21 system of patient treatments. The average plasma concentrations of drugs in patients under the standard patterns of treatment, is approximately 10 μ M for efavirenz and lopinavir, and 5 μ M for elvitegravir, (Jackson et al., 2011; Pérez-Molina et al., 2008; Ramanathan et al., 2011) indicating that *in vitro* findings in human adipocytes and muscle cells occur in the range concentrations that may have *in vivo* relevance. However, in our study efavirenz and elvitegravir were added to adipocyte and myotube cell cultures in a serum-free or low serum containing medium (culture conditions intrinsically required for differentiation *in vitro* of human adipocytes and muscle cells), and this may result in a higher availability of the drugs to cells due to lack of binding to proteins. On the other hand, the concentrations of efavirenz and elvitegravir required to cause the FGF21 induction/KLB repression effect in hepatic cells were higher; however, these cell cultures require 10% FBS, which results in a high presence of drug-binding proteins in the medium and a reduction in the actual amounts of drug available to the cell is likely to occur. On the other hand, some studies have measured the accumulation of some antiretroviral drugs in adipose tissues and showed a range close to 100 nmol/g tissue for efavirenz and 1 nmol/g for the PI ritonavir (Dupin et al., 2002); thus, intracellular concentrations may be, at least for efavirenz, higher than plasma concentrations.

In summary, we have found that several antiretroviral drugs used in HIV therapy belonging to distinct drug families cause a reciprocal effect of induction of FGF21 expression and repression of KLB expression in human cells in culture, alterations commonly occurring in HIV patients under antiretroviral treatment. ER stress/oxidative stress mechanisms appear to be involved in this effect. Considering the potential role of altered FGF21 system in metabolic, cardiovascular and bone-related alterations, present data could inspire further research in the context of improvement of antiretroviral treatments to minimize adverse effects of antiretroviral in HIV-1-infected patients.

Funding information

This research was supported by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias (grants PI14-00063, PI14-00700), Ministerio de Ciencia e Innovación (grant SAF2014-23636), co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF); and Red de Investigación en SIDA (RD16/0025/0006), Instituto de Salud Carlos III. R.M. was supported by PFIS PhD scholarship from AES, ISCIII, MINECO, Spain; T.Q.-L. was supported by a CONACyT (National Council for Science and Technology in Mexico) PhD scholarship.

REFERENCES

- Apostolova, N., Gomez-Sucerquia, L.J., Alegre, F., Funes, H.A., Victor, V.M., Barrachina, M.D., Blas-Garcia, A., Esplugues, J. V., 2013. ER stress in human hepatic cells treated with Efavirenz: Mitochondria again. *J. Hepatol.* 59, 780–789. doi:10.1016/j.jhep.2013.06.005
- Auclair, M., Afonso, P., Capel, E., Caron-Debarle, M., Capeau, J., 2014. Impact of darunavir, atazanavir and lopinavir boosted with ritonavir on cultured human endothelial cells: Beneficial effect of pravastatin. *Antivir. Ther.* 19, 773–782. doi:10.3851/IMP2752
- Borsa, M., Ferreira, P.L.C., Petry, A., Ferreira, L.G.E., Camargo, M.M., Bou-Habib, D.C., Pinto, A.R., 2015. HIV infection and antiretroviral therapy lead to unfolded protein response activation. *Viol. J.* 12, 77. doi:10.1186/s12985-015-0298-0
- Capel, E., Auclair, M., Caron-Debarle, M., Capeau, J., 2012. Effects of ritonavir-boosted darunavir, atazanavir and lopinavir on adipose functions and insulin sensitivity in murine and human adipocytes. *Antivir. Ther.* 17, 549–556. doi:10.3851/IMP1988
- Caron-Debarle, M., Lagathu, C., Boccara, F., Vigouroux, C., Capeau, J., 2010. HIV-associated lipodystrophy: from fat injury to premature aging. *Trends Mol. Med.* doi:10.1016/j.molmed.2010.03.002
- Caron, M., Auclair, M., Vissian, A., Vigouroux, C., Capeau, J., 2008. Contribution of mitochondrial dysfunction and oxidative stress to cellular premature senescence induced by antiretroviral thymidine analogues. *Antivir. Ther.* 13, 27–38.
- Deeks, S.G., Lewin, S.R., Havlir, D. V., 2013. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *Lancet.* doi:10.1016/S0140-6736(13)61809-7

- Díaz-Delfín, J., del Mar Gutiérrez, M., Gallego-Escuredo, J.M., Domingo, J.C., Gracia Mateo, M., Villarroya, F., Domingo, P., Giralt, M., 2011. Effects of nevirapine and efavirenz on human adipocyte differentiation, gene expression, and release of adipokines and cytokines. *Antiviral Res.* 91, 112–119. doi:10.1016/j.antiviral.2011.04.018
- Díaz-Delfín, J., Domingo, P., Mateo, M.G., Gutierrez, M.D.M., Domingo, J.C., Giralt, M., Villarroya, F., 2012a. Effects of rilpivirine on human adipocyte differentiation, gene expression, and release of adipokines and cytokines. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 3369–3375. doi:10.1128/AAC.00104-12
- Díaz-Delfín, J., Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, M., Caelles, C., Villarroya, F., 2012b. TNF- α represses β -klotho expression and impairs FGF21 action in adipose cells: Involvement of JNK1 in the FGF21 pathway. *Endocrinology* 153, 4238–4245. doi:10.1210/en.2012-1193
- Díaz-Delfín, J., Domingo, P., Giralt, M., Villarroya, F., 2013. Maraviroc reduces cytokine expression and secretion in human adipose cells without altering adipogenic differentiation. *Cytokine* 61, 808–815.
- Domingo, P., Gallego-Escuredo, J.M., Domingo, J.C., Gutiérrez, M. del M., Mateo, M.G., Fernández, I., Vidal, F., Giralt, M., Villarroya, F., 2010. Serum FGF21 levels are elevated in association with lipodystrophy, insulin resistance and biomarkers of liver injury in HIV-1-infected patients. *AIDS* 24, 2629–2637. doi:10.1097/QAD.0b013e3283400088
- Dupin, N., Buffet, M., Marcelin, A.-G., Lamotte, C., Gorin, I., Ait-Arkoub, Z., Tréluyer, J.-M., Bui, P., Calvez, V., Peytavin, G., 2002. HIV and antiretroviral drug distribution in plasma and fat tissue of HIV-infected patients with lipodystrophy. *AIDS* 16, 2419–2424.
- Dushay, J., Chui, P.C., Gopalakrishnan, G.S., Varela-Rey, M., Crawley, M., Fisher, F.M., Badman, M.K., Martinez-Chantar, M.L., Maratos-Flier, E.,

2010. Increased fibroblast growth factor 21 in obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 139, 456–463.
doi:10.1053/j.gastro.2010.04.054
- Fisher, F.M., Chui, P.C., Antonellis, P.J., Bina, H.A., Kharitonov, A., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., 2010. Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes* 59, 2781–2789. doi:10.2337/db10-0193
- Gaich, G., Chien, J.Y., Fu, H., Glass, L.C., Deeg, M.A., Holland, W.L., Kharitonov, A., Bumol, T., Schilske, H.K., Moller, D.E., 2013. The effects of LY2405319, an FGF21 Analog, in obese human subjects with type 2 diabetes. *Cell Metab.* 18, 333–340. doi:10.1016/j.cmet.2013.08.005
- Gallego-Escuredo, J.M., Del Mar Gutierrez, M., Diaz-Delfin, J., Domingo, J.C., Mateo, M.G., Domingo, P., Giralt, M., Villarroya, F., 2010. Differential effects of efavirenz and lopinavir/ritonavir on human adipocyte differentiation, gene expression and release of adipokines and pro-inflammatory cytokines. *Curr. HIV Res.* 8, 545–553.
doi:10.2174/157016210793499222
- Gallego-Escuredo, J.M., Domingo, P., Gutiérrez, M.D.M., Mateo, M.G., Cabeza, M.C., Fontanet, A., Vidal, F., Domingo, J.C., Giralt, M., Villarroya, F., 2012. Reduced levels of serum FGF19 and impaired expression of receptors for endocrine FGFs in adipose tissue from HIV-infected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 61, 527–34. doi:10.1097/QAI.0b013e318271c2c7
- Gallego-Escuredo, J.M., Gómez-Ambrosi, J., Catalan, V., Domingo, P., Giralt, M., Frühbeck, G., Villarroya, F., 2015. Opposite alterations in FGF21 and FGF19 levels and disturbed expression of the receptor machinery for endocrine FGFs in obese patients. *Int. J. Obes. (Lond).* 39, 121–129.
doi:10.1038/ijo.2014.76
- Giralt, M., Domingo, P., Villarroya, F., 2011. Adipose tissue biology and HIV-infection. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25, 487–499.

doi:10.1016/j.beem.2010.12.001

Giralt, M., Gavaldà-Navarro, A., Villarroya, F., 2015. Fibroblast growth factor-21, energy balance and obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 418, 66–73.

doi:10.1016/j.mce.2015.09.018

Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Mampel, T., Villarroya, F., 2011. Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 286, 12983–12990.

doi:10.1074/jbc.M110.215889

Hondares, E., Gallego-Escuredo, J.M., Flachs, P., Frontini, A., Cereijo, R., Goday, A., Perugini, J., Kopecky, P., Giralt, M., Cinti, S., Kopecky, J., Villarroya, F., 2014. Fibroblast growth factor-21 is expressed in neonatal and pheochromocytoma-induced adult human brown adipose tissue.

Metabolism. 63, 312–317. doi:10.1016/j.metabol.2013.11.014

Jackson, A., Hill, A., Puls, R., Else, L., Amin, J., Back, D., Lin, E., Khoo, S., Emery, S., Morley, R., Gazzard, B., Boffito, M., 2011. Pharmacokinetics of plasma lopinavir/ritonavir following the administration of 400/100 mg, 200/150 mg and 200/50 mg twice daily in HIV-negative volunteers. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 635–640.

doi:10.1093/jac/dkq468

Ji, K., Zheng, J., Lv, J., Xu, J., Ji, X., Luo, Y.B., Li, W., Zhao, Y., Yan, C., 2015. Skeletal muscle increases FGF21 expression in mitochondrial disorders to compensate for energy metabolic insufficiency by activating the mTOR-YY1-PGC1 α pathway. *Free Radic. Biol. Med.* 84, 161–170.

doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.020

Kurosu, H., Choi, M., Ogawa, Y., Dickson, A.S., Goetz, R., Eliseenkova, A. V., Mohammadi, M., Rosenblatt, K.P., Kliwer, S.A., Kuro-o, M., 2007. Tissue-specific Expression of betaKlotho and Fibroblast Growth Factor (FGF)

Receptor Isoforms Determines Metabolic Activity of FGF19 and FGF21. *J. Biol. Chem.* 282, 26687–26695. doi:10.1074/jbc.M704165200

Lagathu, C., Eustace, B., Prot, M., Frantz, D., Gu, Y., Bastard, J.P., Maachi, M., Azoulay, S., Briggs, M., Caron, M., Capeau, J., 2007. Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages. *Antivir. Ther.* 12, 489–500.

Lagathu, C., Cossarizza, A., Béréziat, V., Nasi, M., Capeau, J., Pinti, M., 2017. Basic science and pathogenesis of ageing with HIV: potential mechanisms and biomarkers. *AIDS* 31 Suppl 2, S105–S119.
doi:10.1097/QAD.0000000000001441

Lindegård, B., Hvid, T., Grøndahl, T., Frosig, C., Gerstoft, J., Hojman, P., Pedersen, B.K., 2013. Expression of fibroblast growth factor-21 in muscle is associated with lipodystrophy, insulin resistance and lipid disturbances in patients with HIV. *PLoS One* 8, e55632. doi:10.1371/journal.pone.0055632

Markan, K.R., Naber, M.C., Ameka, M.K., Anderegg, M.D., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., Mohammadi, M., Potthoff, M.J., 2014. Circulating FGF21 Is Liver Derived and Enhances Glucose Uptake During Refeeding and Overfeeding. *Diabetes* 63, 4057–4063. doi:10.2337/db14-0595

Miehle, K., Ebert, T., Kralisch, S., Hoffmann, A., Kratzsch, J., Schlögl, H., Stumvoll, M., Fasshauer, M., 2016. Serum concentrations of fibroblast growth factor 21 are elevated in patients with congenital or acquired lipodystrophy. *Cytokine* 83, 239–244. doi:10.1016/j.cyto.2016.04.015

Moure, R., Domingo, P., Gallego-Escuredo, J.M., Villarroya, J., Gutierrez, M.D.M., Mateo, M.G., Domingo, J.C., Giralt, M., Villarroya, F., 2016. Impact of elvitegravir on human adipocytes: Alterations in differentiation, gene expression and release of adipokines and cytokines. *Antiviral Res.* 132, 59–65. doi:10.1016/j.antiviral.2016.05.013

Pérez-Molina, J.A., Domingo, P., Martínez, E., Moreno, S., 2008. The role of

efavirenz compared with protease inhibitors in the body fat changes associated with highly active antiretroviral therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* doi:10.1093/jac/dkn191

Ramanathan, S., Mathias, A.A., German, P., Kearney, B.P., 2011. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of the HIV integrase inhibitor elvitegravir. *Clin. Pharmacokinet.* doi:10.2165/11584570-000000000-00000

Ribas, F., Villarroya, J., Hondares, E., Giralt, M., Villarroya, F., 2014. FGF21 expression and release in muscle cells: involvement of MyoD and regulation by mitochondria-driven signalling. *Biochem. J.* 463, 191–199. doi:10.1042/BJ20140403

Schaap, F.G., Kremer, A.E., Lamers, W.H., Jansen, P.L.M., Gaemers, I.C., 2013. Fibroblast growth factor 21 is induced by endoplasmic reticulum stress. *Biochimie* 95, 692–699. doi:10.1016/j.biochi.2012.10.019

Song, B., Scheuner, D., Ron, D., Pennathur, S., Kaufman, R.J., 2008. Chop deletion reduces oxidative stress, improves ?? cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J. Clin. Invest.* 118, 3378–3389. doi:10.1172/JCI34587

Srinivasa, S., Grinspoon, S.K., 2014. Metabolic and body composition effects of newer antiretrovirals in HIV-infected patients. *Eur. J. Endocrinol.* doi:10.1530/EJE-13-0967

Srinivasa, S., Wong, K., Fitch, K. V., Wei, J., Petrow, E., Cypess, A.M., Torriani, M., Grinspoon, S.K., 2015. Effects of lifestyle modification and metformin on irisin and FGF21 among HIV-infected subjects with the metabolic syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 82, 678–685. doi:10.1111/cen.12582

Suomalainen, A., 2013. Fibroblast growth factor 21: a novel biomarker for human muscle-manifesting mitochondrial disorders. *Expert Opin. Med.*

Diagn. 7, 313–7. doi:10.1517/17530059.2013.812070

Talukdar, S., Zhou, Y., Li, D., Rossulek, M., Dong, J., Somayaji, V., Weng, Y., Clark, R., Lanba, A., Owen, B.M., Brenner, M.B., Trimmer, J.K., Gropp, K.E., Chabot, J.R., Erion, D.M., Rolph, T.P., Goodwin, B., Calle, R.A., 2016. A long-acting FGF21 molecule, PF-05231023, decreases body weight and improves lipid profile in non-human primates and type 2 diabetic subjects. *Cell Metab.* 23, 427–440. doi:10.1016/j.cmet.2016.02.001

Wabitsch, M., Brenner, R.E., Melzner, I., Braun, M., Möller, P., Heinze, E., Debatin, K.-M., Hauner, H., 2001. Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int. J. Obes.* 25, 8–15. doi:10.1038/sj.ijo.0801520

Wan, X.S., Lu, X.H., Xiao, Y.C., Lin, Y., Zhu, H., Ding, T., Yang, Y., Huang, Y., Zhang, Y., Liu, Y.L., Xu, Z.M., Xiao, J., Li, X.K., 2014. ATF4- and CHOP-dependent induction of FGF21 through endoplasmic reticulum stress. *Biomed Res. Int.* 2014. doi:10.1155/2014/807874

Wang, H., Qiang, L., Farmer, S.R., 2008. Identification of a domain within peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulating expression of a group of genes containing fibroblast growth factor 21 that are selectively repressed by SIRT1 in adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 28, 188–200. doi:10.1128/MCB.00992-07

Wang, S., Kaufman, R.J., 2012. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J. Cell Biol.* 197, 857–867. doi:10.1083/jcb.201110131

Zha, B.S., Wan, X., Zhang, X., Zha, W., Zhou, J., Wabitsch, M., Wang, G., Lyall, V., Hylemon, P.B., Zhou, H., 2013. HIV Protease Inhibitors Disrupt Lipid Metabolism by Activating Endoplasmic Reticulum Stress and Inhibiting Autophagy Activity in Adipocytes. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0059514

Zhang, X., Yeung, D.C.Y., Karpisek, M., Stejskal, D., Zhou, Z.-G., Liu, F., Wong, R.L.C., Chow, W.-S., Tso, A.W.K., Lam, K.S.L., Xu, A., 2008. Serum FGF21 Levels Are Increased in Obesity and Are Independently Associated With the Metabolic Syndrome in Humans. *Diabetes* 57, 1246–1253. doi:10.2337/db07-1476

FIGURE LEGENDS

- 1. Figure 1. Effects of antiretroviral drugs, tunicamycin and thapsigargin on FGF21, KLB, CHOP10 and HSPA5 gene expression in HepG2 cells.** Cells were exposed to following drugs: zidovudine (AZT), 100µM; stavudine (D4T), 100µM; tenofovir difumarate (TDF), 5µM; nevirapine (NVP), 20µM; efavirenz (EFV), 50 µM; rilpivirine (RPV), 10µM; lopinavir/ritonavir 4:1 (LPV/r) 20µM; ritonavir (RTV), 20µM; lopinavir (LPV), 20µM; nelfinavir (NFV), 20µM; atazanavir (ATV), 50µM; raltegravir (RAL), 50µM; elvitegravir (ELV), 50µM; maraviroc (MRV), 4µM; tunicamycin (TUN), 2µM; thapsigargin (THAP), 2µM. Data are presented as means ± SEM from 4–5 independent experiments, and are expressed relative to values from control cells (defined as 1). *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 for each drug treatment vs. control.
- 2. Figure 2. Dose response effects of efavirenz, lopinavir/ritonavir, elvitegravir and raltegravir on the expression of FGF21, KLB, CHOP10 and HSPA5 in HepG2 cells.** HepG2 cells were treated with the indicated concentrations of drugs for 24h. Data are presented as means ± SEM from 4–5 independent experiments, and are expressed relative to values from control cells (defined as 1). *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 for each drug treatment vs. control.
- 3. Figure 3. Effects of antiretroviral drugs and thapsigargin on the FGF21 promoter activity.** Data correspond to luciferase activity in HepG2 cells transiently transfected with plasmid constructs in which luciferase is driven by the –1497/+5 (-1.5 Kb-Luc), or by the -77/+5 (-77 bp-Luc) 5' regions of the FGF21 gene. Cells were treated for 24h with the indicated concentrations of drugs: lopinavir/ritonavir 4:1 (LPV/r), 20µM; efavirenz (EFV), 50 µM; thapsigargin (THAP), 2µM. Data are normalized by Renilla luciferase activity driven by the co-transfected pRL-CMV plasmid, used as

internal control of transfection efficiency. Data are means \pm SEM from 4–5 independent experiments, and are expressed relative to values from control cells (defined as 1). *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 for each drug treatment vs. control.

4. Figure 4. Effects of antiretroviral drugs on FGF21, KLB, CHOP10 and HSPA5 gene expression in human SGBS adipocytes during differentiation. SGBS human preadipocytes were differentiated in culture into adipocytes in the presence of the following drugs: zidovudine (AZT), 50 μ M; stavudine (D4T), 50 μ M; efavirenz (EFV), 5 μ M; rilpivirine (RPV), 10 μ M; lopinavir/ritonavir 4:1 (LPV/r), 20 μ M; raltegravir (RAL), 5 μ M; elvitegravir (ELV), 5 μ M. Data are presented as means \pm SEM from 4–5 independent experiments, and are expressed relative to values from control cells (defined as 1). *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 for each drug treatment vs. control.

5. Figure 5. Dose response effects of efavirenz, lopinavir/ritonavir, elvitegravir and raltegravir on the expression of FGF21, KLB, CHOP10 and HSPA5 in SGBS human adipocytes during differentiation. SGBS human preadipocytes were differentiated in culture into adipocytes in the presence of the indicated concentrations of drugs. Data are presented as means \pm SEM from 4–5 independent experiments, and are expressed relative to values from control cells (defined as 1). *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 for each drug treatment vs. control.

6. Figure 6. Effects of antiretroviral drugs, tunicamycin and thapsigargin on FGF21, KLB, CHOP10 and HSPA5 gene expression in human SGBS adipocytes differentiated in culture. SGBS human adipocytes differentiated in culture were treated for 24h with the following drugs: zidovudine (AZT), 100 μ M; stavudine (D4T), 100 μ M; efavirenz (EFV), 20 μ M; rilpivirine (RPV), 15 μ M; lopinavir/ritonavir 4:1 (LPV/r), 20 μ M;

raltegravir (RAL), 50 μ M; elvitegravir (ELV), 20 μ M; tunicamycin (TUN), 2 μ M; thapsigargin (THAP), 2 μ M. Data are presented as means \pm SEM from 4–5 independent experiments, and are expressed relative to values from control cells (defined as 1). *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 for each drug treatment vs. control.

7. Figure 7. Dose response effects of efavirenz, lopinavir/ritonavir, elvitegravir and raltegravir on the expression of FGF21, KLB, CHOP10 and HSPA5 in SGBS human adipocytes differentiated in culture. SGBS human preadipocytes were differentiated in culture into adipocytes and treated with the indicated concentrations of drugs for 24h. Data are presented as means \pm SEM from 4–5 independent experiments, and are expressed relative to values from control cells (defined as 1). *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 for each drug treatment vs. control.

8. Figure 8. Effects of antiretroviral drugs, tunicamycin, thapsigargin and rosiglitazone on the KLB promoter activity. Data correspond to luciferase activity in adipogenic HIB-1B cells transiently transfected with a plasmid constructs in which luciferase is driven by the –1055/+45 region of the KLB gene. Cells were treated with the following concentrations of drugs: lopinavir/ritonavir 4:1 (LPV/r), 20 μ M; efavirenz (EFV), 50 μ M; thapsigargin (THAP), 2 μ M; tunicamycin (TUN), 2 μ M; rosiglitazone (ROSI), 2 μ M. Data are normalized by Renilla luciferase activity driven by the co-transfected pRL-CMV plasmid, used as internal control of transfection efficiency. Data are means \pm SEM from 4–5 independent experiments, and are expressed relative to values from control cells (defined as 1). *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 for each drug treatment vs. control.

9. Figure 9. Effects of antiretroviral drugs, tunicamycin and thapsigargin on FGF21, KLB, CHOP10 and HSPA5 gene expression

in human LHCN-M2 skeletal muscle cells differentiated in culture.

LHCN-M2 myotubes differentiated in culture were treated for 24h with the following drugs: zidovudine (AZT), 100µM; stavudine (D4T), 100µM; tenofovir difumarate (TDF), 5µM; nevirapine (NVP), 20µM; efavirenz (EFV), 50µM; rilpivirine (RPV), 10µM; lopinavir/ritonavir 4:1 (LPV/r), 20µM; RTV 20µM, LPV 20µM, nelfinavir (NFV), 20µM; atazanavir (ATV), 50µM; maraviroc (MRV), 4µM; tunicamycin (TUN), 2µM; thapsigargin (THAP), 2µM. Data on mRNA levels are presented as means ± SEM from 4–5 independent experiments, and are expressed relative to values from control cells (defined as 1). *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 for each drug treatment vs. control.

10. Figure 10. Effects of the ER inhibitor PBA or the antioxidant Trolox on the actions of antiretroviral drugs on FGF21, KLB, CHOP10 and HSPA5 gene expression in human SGBS adipocytes differentiated in culture. SGBS human preadipocytes differentiated in culture were treated for 24h with the following drugs: efavirenz (EFV), 50µM; rilpivirine (RPV), 10µM; lopinavir/ritonavir 4:1 (LPV/r), 20µM; thapsigargin (THAP), 2µM; in the presence, when indicated of 2 mM phenylbutyric acid (PBA) or 1 mM Trolox. Data are presented as means ± SEM from 4–5 independent experiments, and are expressed relative to values from control cells (defined as 1). *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 for each drug treatment vs. control, and #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001 for the effects of PBA or Trolox.

Figure 1

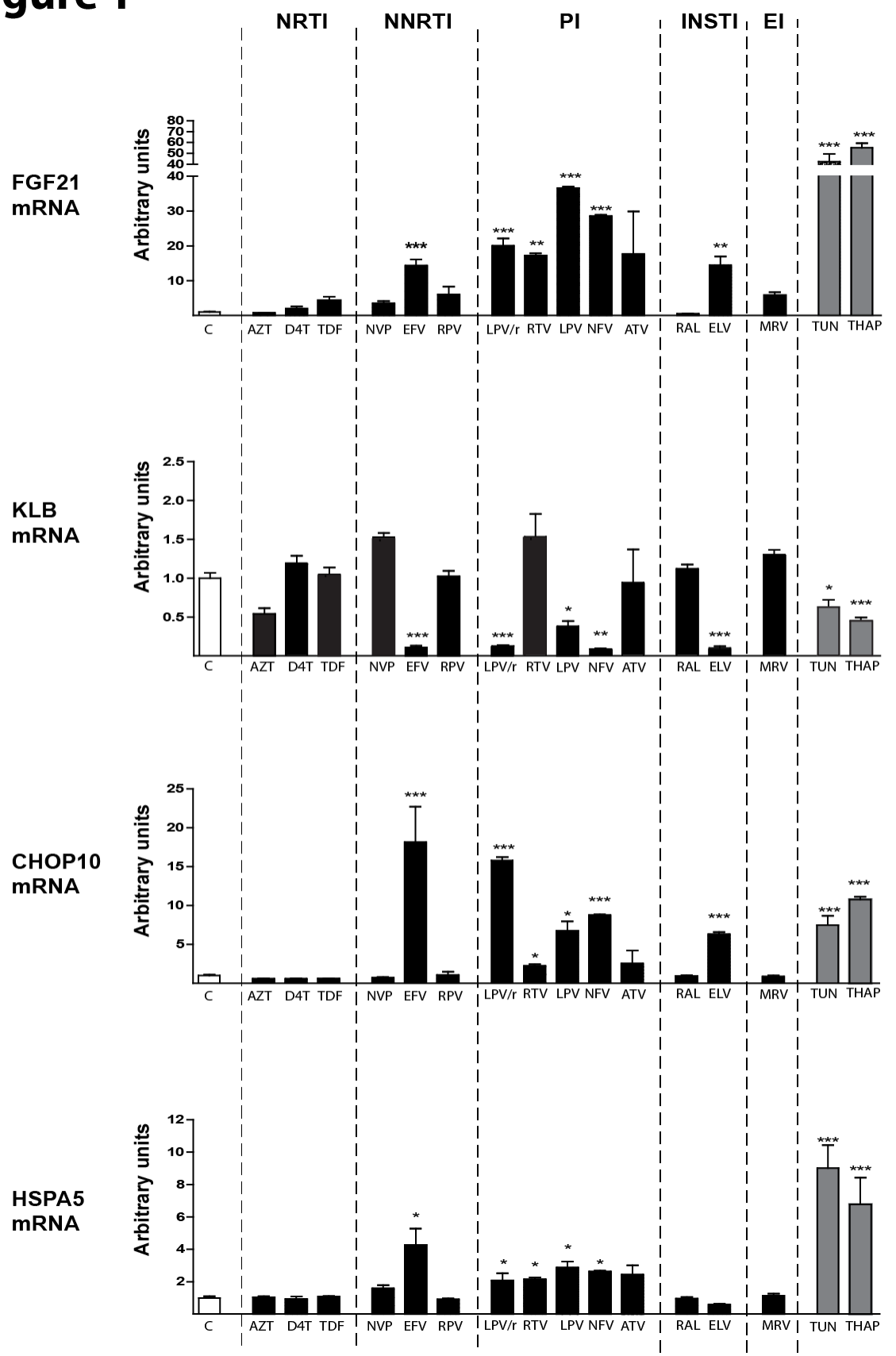


Figure 2

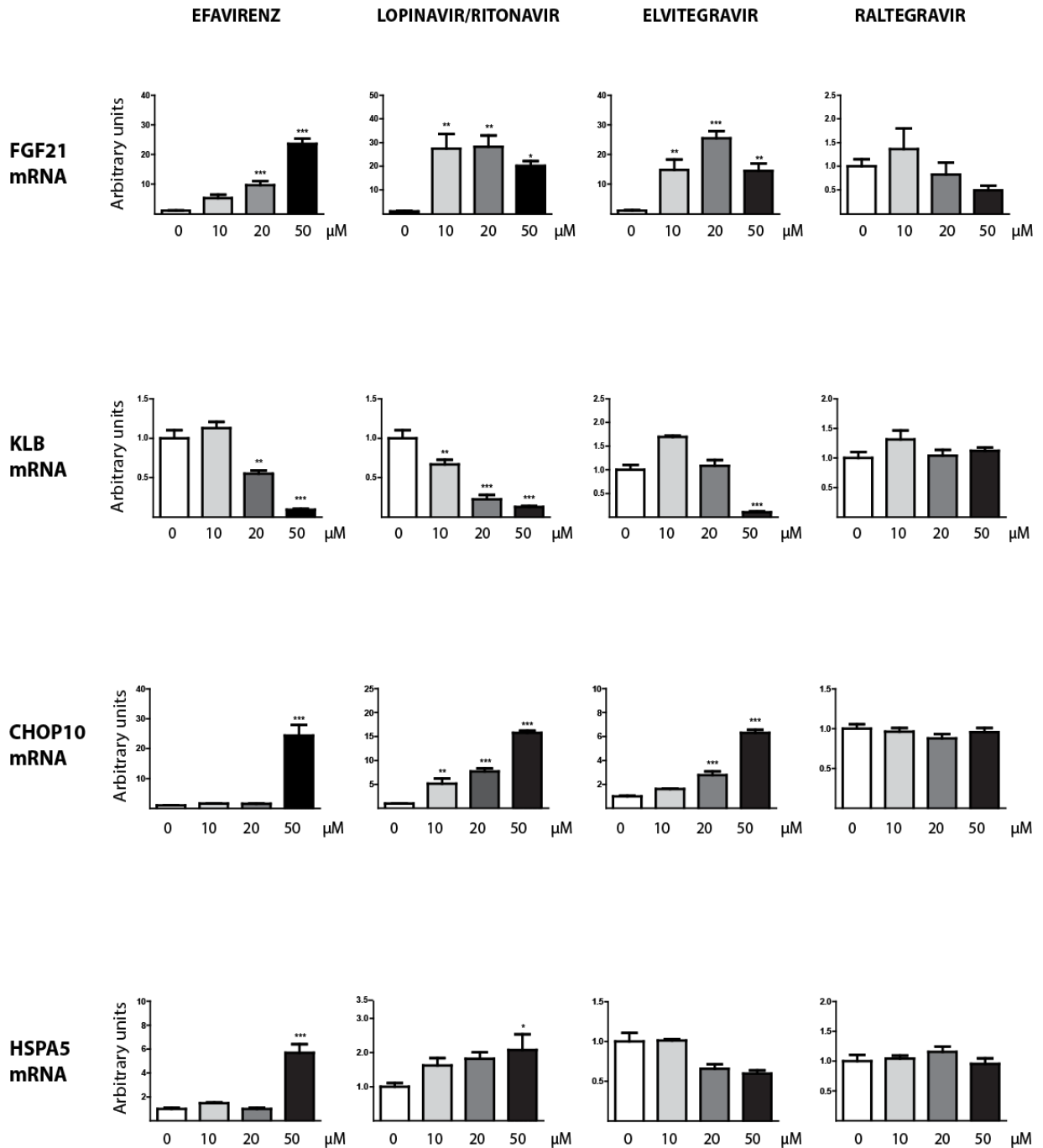


Figure 3

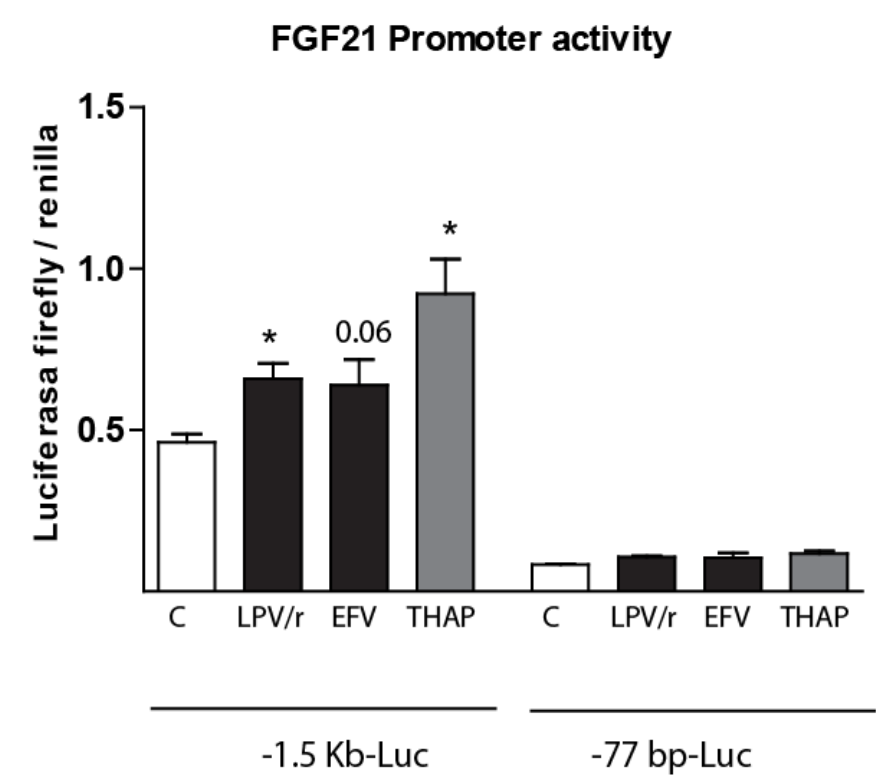


Figure 4

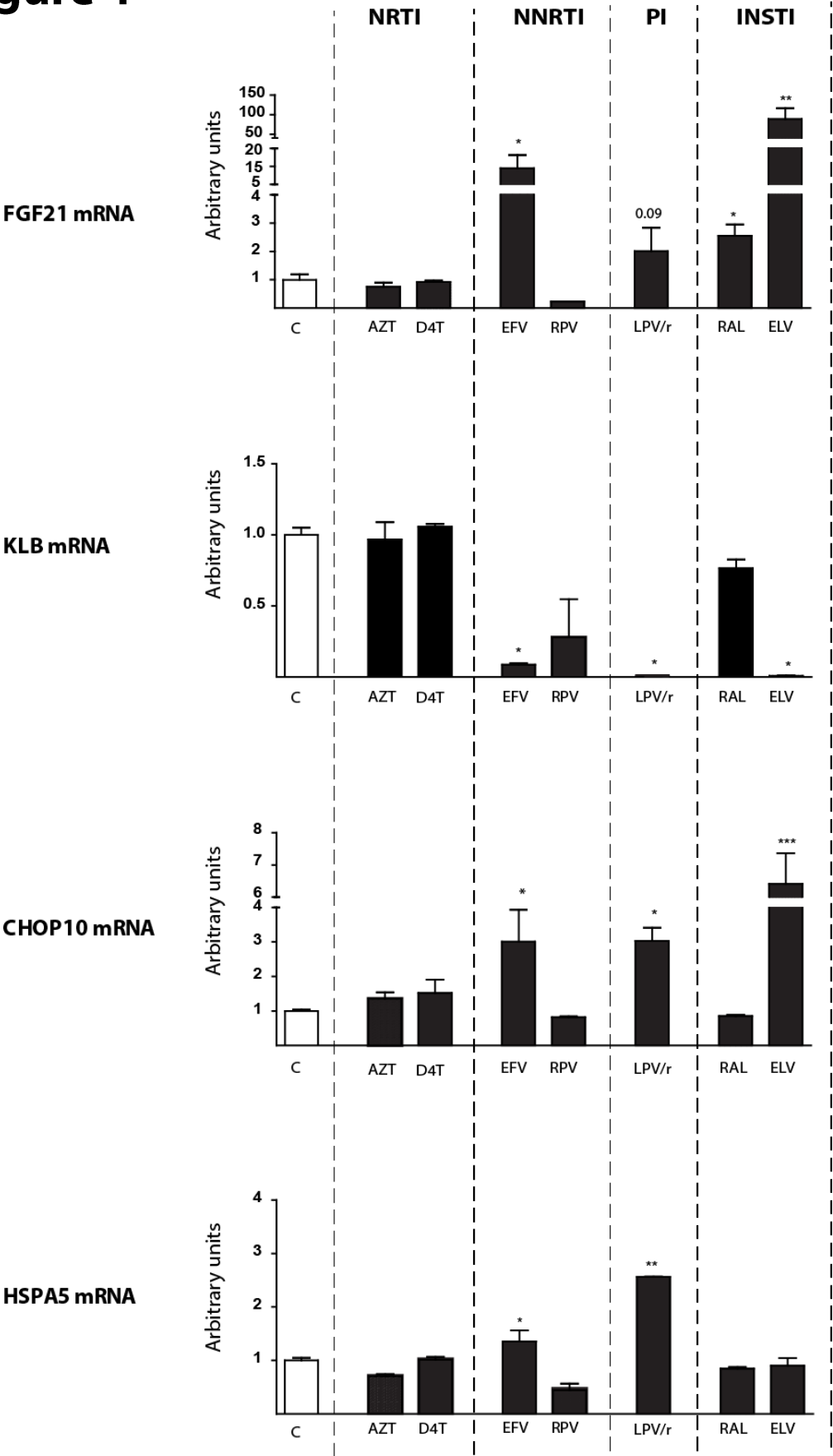


Figure 5

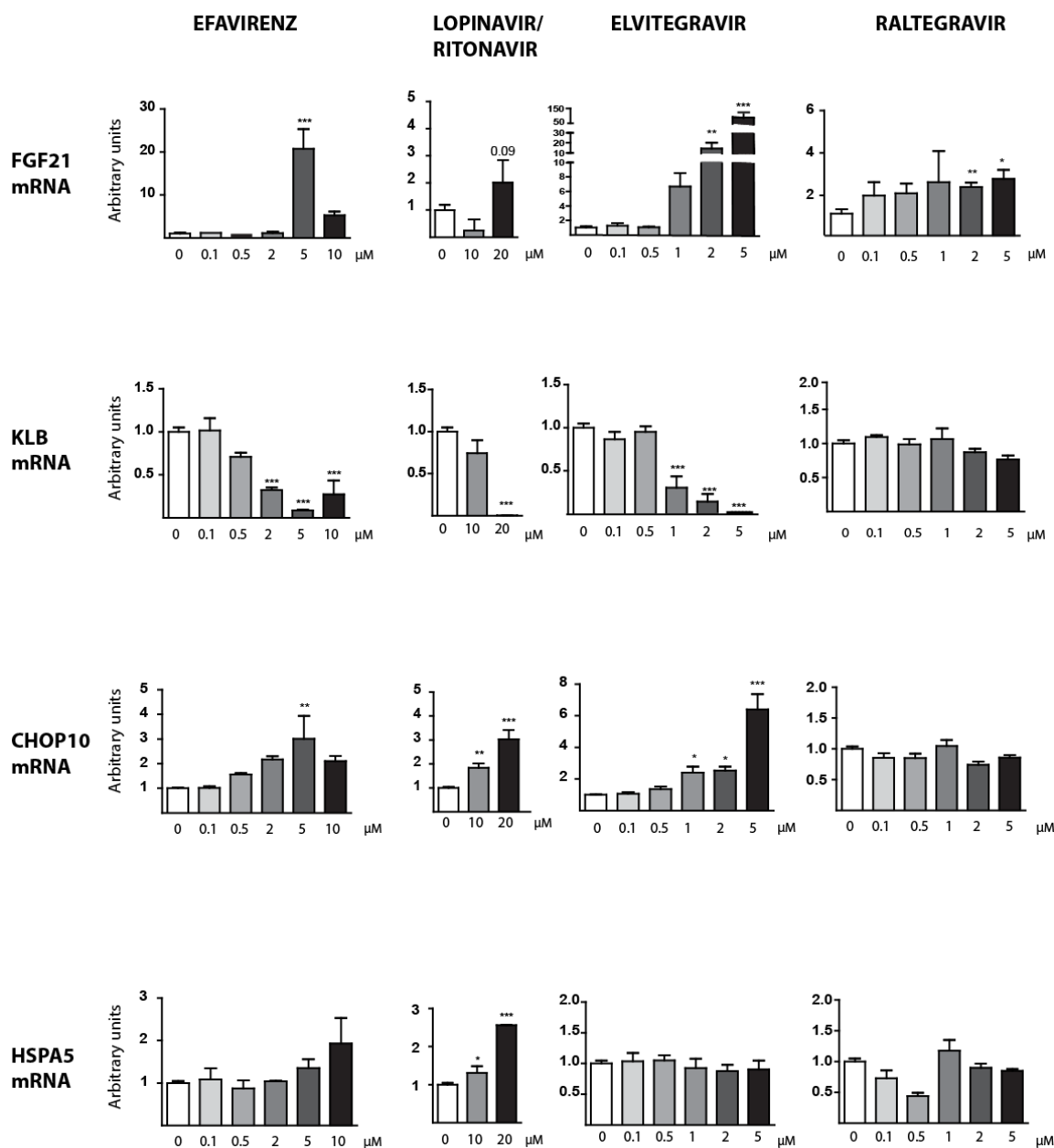


Figure 6

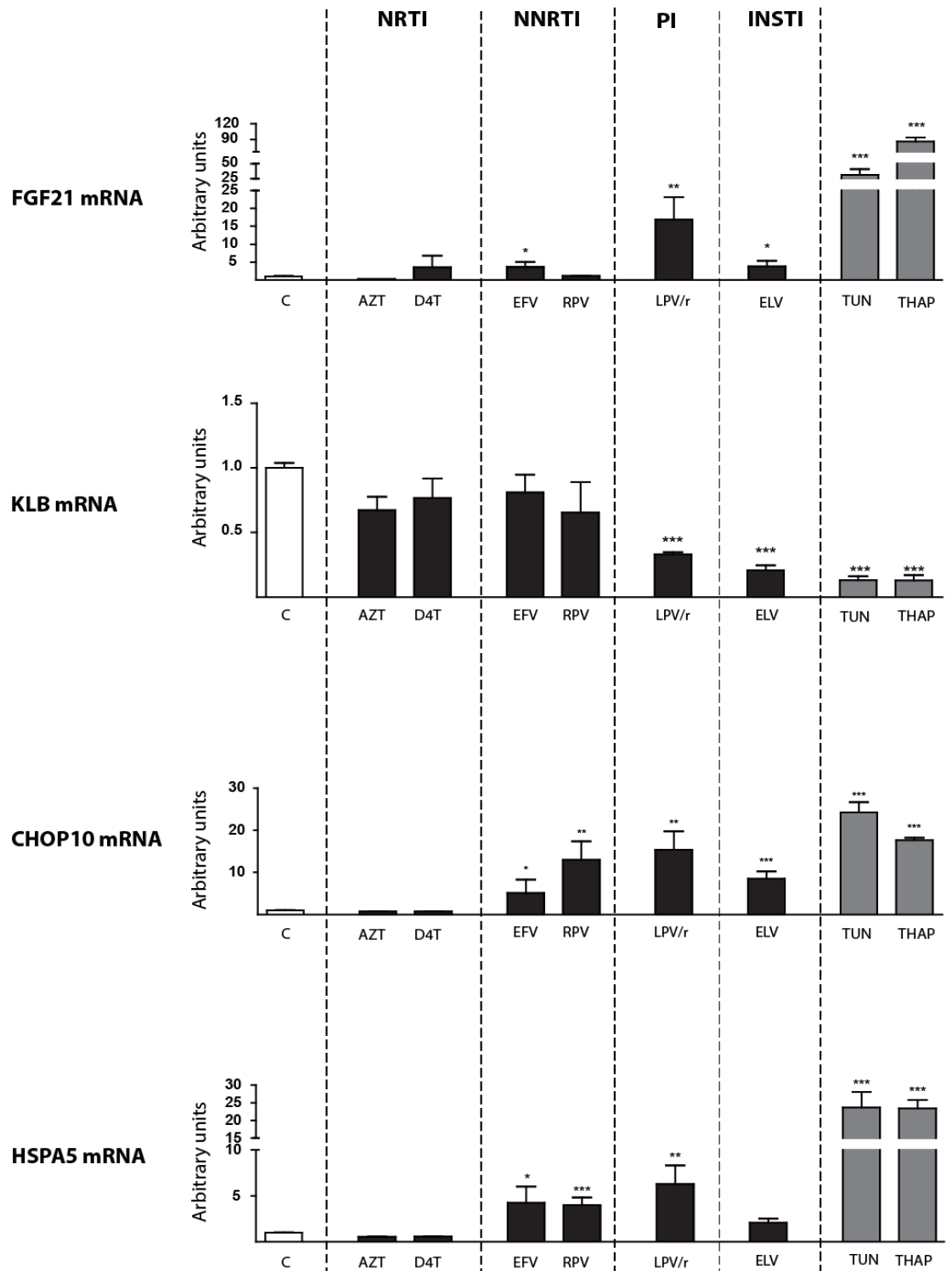


Figure 7

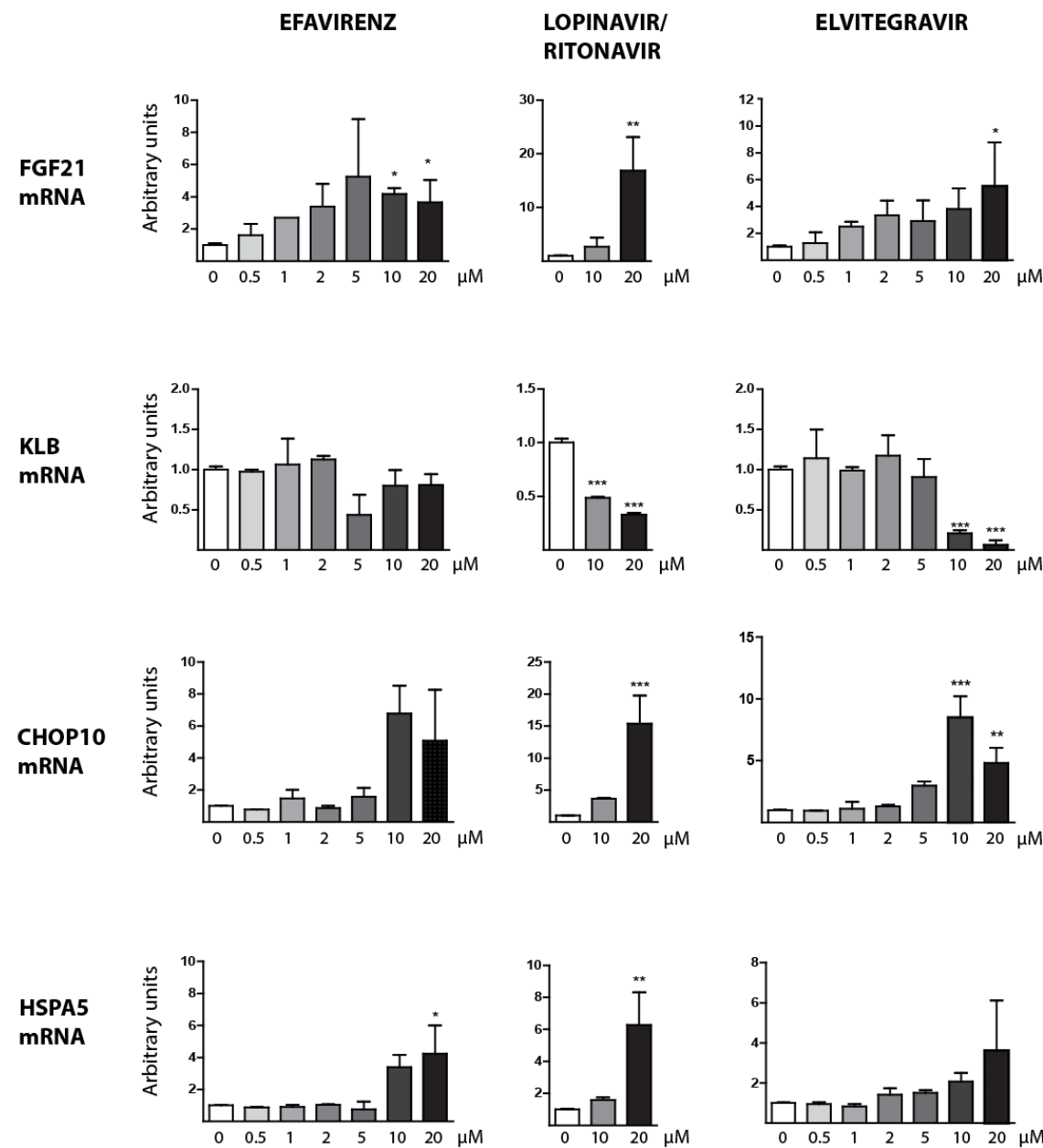


Figure 8

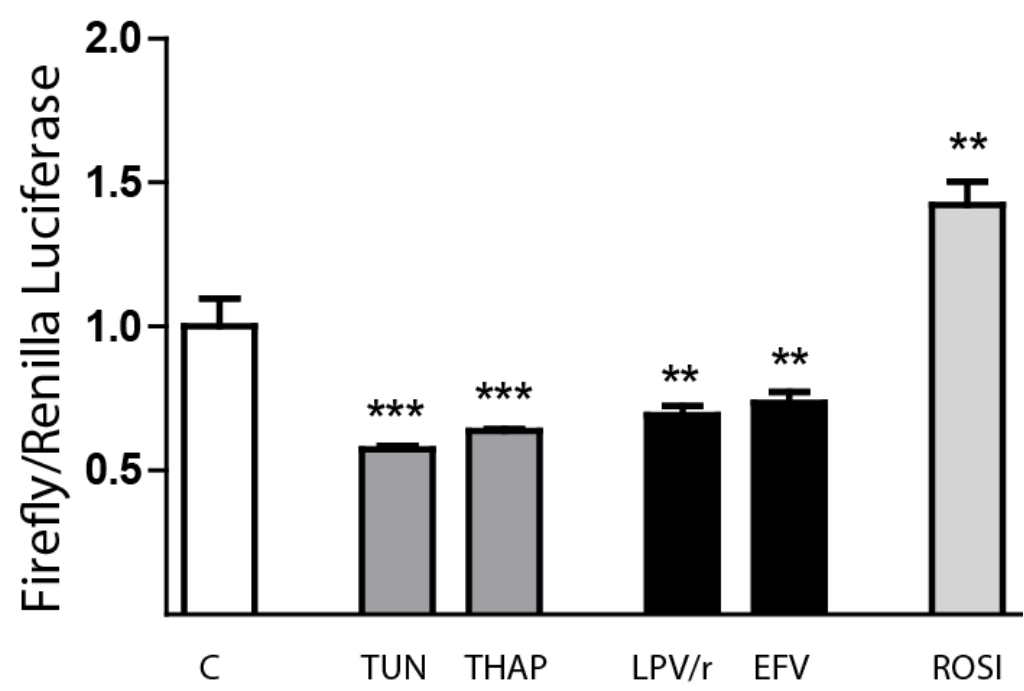


Figure 9

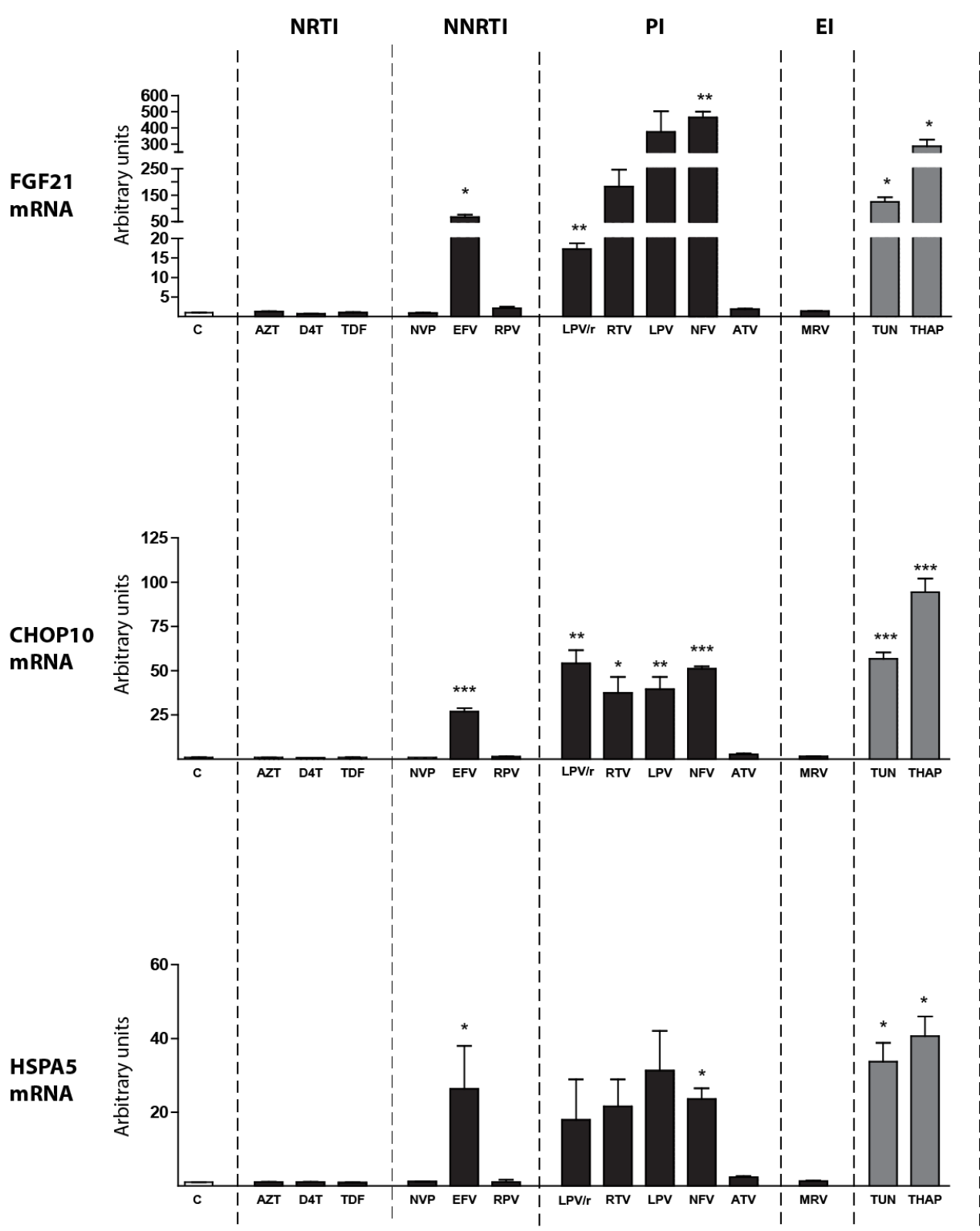
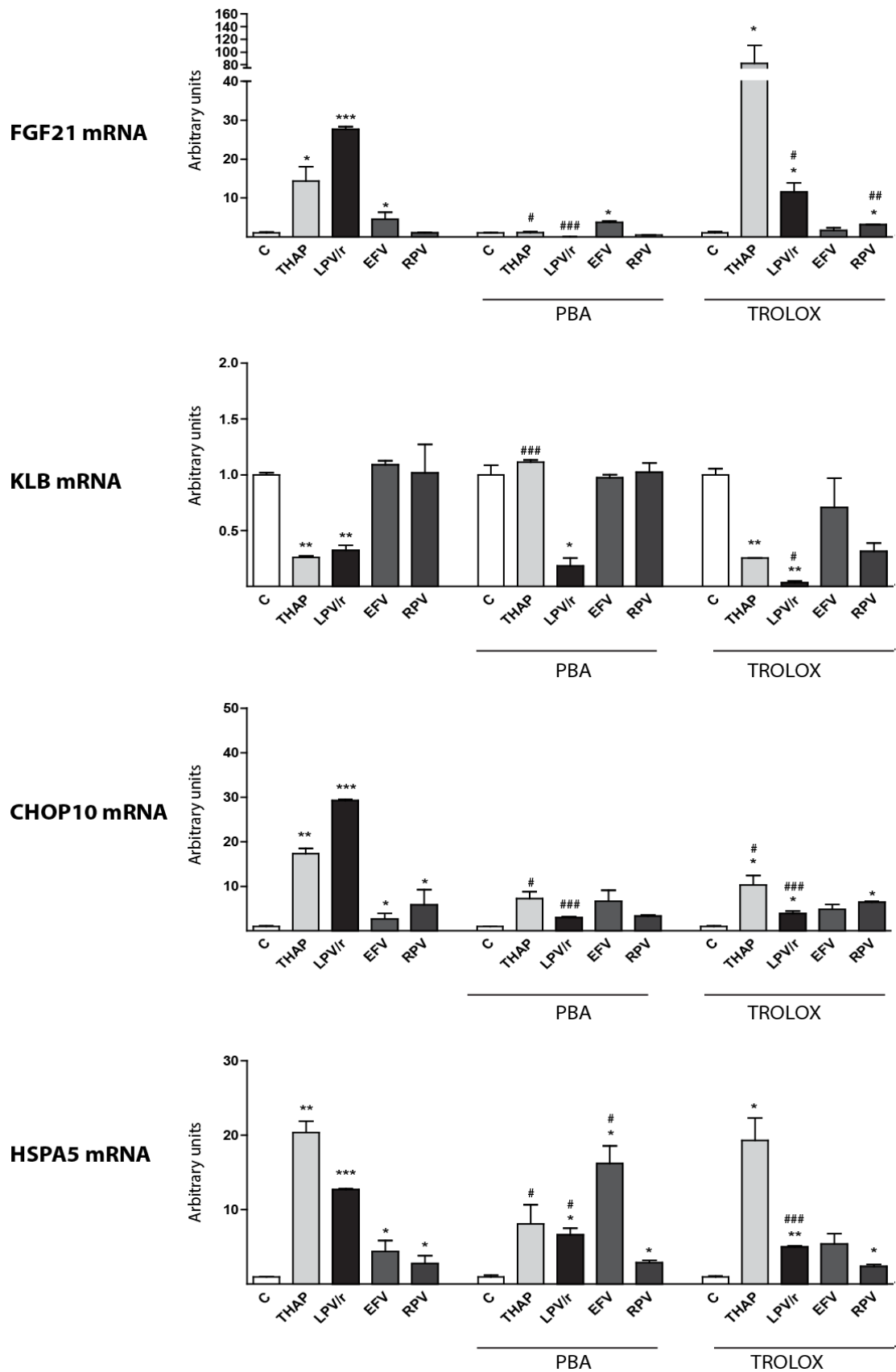


Figure 10



The levels of β -Klotho determine the thermogenic responsiveness of adipose tissues: involvement of the autocrine action of FGF21

Revista: Molecular Metabolism

PMID: [Enviado]

Título: *Los niveles de β -klotho determinan la respuesta termogénica del tejido adiposo: implicación de una acción autocrina de FGF21.*

Resumen: La *molécula fibroblast growth factor-21* (FGF21) es un importante regulador metabólico que ha adquirido una gran relevancia en los últimos años en la búsqueda de tratamientos contra la obesidad y la diabetes tipo II debido, en parte, a su capacidad de promover la oxidación de glucosa y la actividad termogénica de los tejidos adiposos blanco y marrón. Sin embargo, en la obesidad y la diabetes se observa un descenso en los niveles de β -klotho, un correceptor de FGF21 necesario para su señalización. Se ha hipotetizado que la disminución de β -klotho podría estar relacionada con el estado de resistencia a FGF21 que se observa en la obesidad y en la diabetes. En este trabajo estudiamos cómo afecta una disminución en los niveles de β -klotho a la capacidad termogénica de los tejidos adiposos. Para ello analizamos el metabolismo en condiciones normales y la respuesta al frío crónico en ratones con una delección total (KLB *knock-out*) o parcial (heterocigotos para KLB). En estos animales observamos una relación lineal inversa entre la dosis génica de β -klotho y la adiposidad de los individuos y la expresión de FGF21 en el hígado y los tejidos adiposos. Además, observamos que la disminución de β -klotho produce una leve disminución en la capacidad termogénica del adiposo marrón y una potente pérdida en la capacidad de realizar *browning* del tejido adiposo blanco inguinal. Paralelamente se realizaron experimentos con cultivos primarios

de adipocitos beige y marrones procedentes de animales *wild-type*, heterocigotos y *knock-out* para β -klotho que fueron tratados con un agonista del receptor β -3-adrenérgico. Se observó una pérdida en la capacidad de respuesta a este estímulo en las células procedentes de animales *knock-out* y heterocigotos. Este mismo experimento se realizó con adipocitos marrones y beige procedentes de animales *knock-out* para el gen que codifica FGF21, observándose también una fuerte pérdida en la capacidad de responder a estímulos β -adrenérgicos. Estos resultados indican que β -klotho determina la capacidad de respuesta del tejido adiposo a estímulos termogénicos, lo cual estaría relacionado con una función autocrina de FGF21 en la activación del programa termogénico.

The levels of β -Klotho determine the thermogenic responsiveness of adipose tissues: involvement of the autocrine action of FGF21

Ricardo Moure^{a,b}, Tania Quesada-López^{a,b}, Samantha Morón^{a,b}, Rubén Cereijo^{a,b}, Montserrat Cairó^{a,b}, Alvaro Hernáez^{b,c}, Marta Giralt^{a,b*}, Francesc Villarroya^{a,b*}

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biomedicine, and Institut de Biomedicina (IBUB), University of Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain.

^bCIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Spain.

^cHospital del Mar Medical Research Institute (IMIM), Barcelona, Spain.

Running title: β -klotho influences thermogenic responsiveness.

Keywords: FGF21, β -Klotho, CL316,243, browning, thermogenesis, brown adipose tissue

*To whom correspondence should be addressed:

Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

Av. Diagonal 643, E-08028-Barcelona, Catalonia, Spain

Tel: 34-93-4021525,

Fax: 34-93-4021559,

E-mail: fvillarroya@ub.edu

ABSTRACT

Objectives: Fibroblast growth factor-21 (FGF21) is a hormonal regulator of metabolism promoting glucose oxidation and the thermogenic capacity of adipose tissues. A decrease in the levels of β -klotho (KLB), the co-receptor required for FGF21 action, occurs in brown (BAT) and white (WAT) adipose tissues during obesity, diabetes and lipodystrophy. Reduced β -klotho levels have been proposed to account for FGF21 resistance in these conditions. In this study we explored whether a decrease in the levels of β -klotho affects metabolic regulation and the thermogenic responsiveness of adipose tissues.

Methods: we analyzed the responsiveness of mice with total (KLB-null) or partial (KLB-heterozygotes) ablation of β -klotho to cold exposure, and we determined changes in systemic metabolic profile and the thermogenic and metabolic functions in adipose tissues. We determined also the response (metabolic parameters, gene expression, FGF21 secretion) of brown and beige adipocytes in culture from these mice to the β 3-adrenergic agonist CL-316,243. A parallel study of the responsiveness of FGF21-null brown and beige adipocytes to CL316,243 was performed.

Results: KLB gene dosage was inversely associated with adiposity in mice. Impaired browning of subcutaneous WAT, and milder alterations in BAT, were found in response to cold in association with reduced KLB gene dosage in mice. These effects were cell-autonomous as brown and beige adipocytes in culture bearing total or partial ablation of the KLB gene showed reduced thermogenic responsiveness to β 3-adrenergic activation. Lack of FGF21 mimicked the impaired thermogenic responsiveness due to reduced KLB gene dosage in brown and beige adipocytes.

Conclusions: The levels of KLB in adipose tissues determine their thermogenic capacity in response to cold and/or adrenergic stimuli. An autocrine action of FGF21 in brown and beige adipocytes may account for the role of KLB levels in influencing thermogenic responsiveness.

1. INTRODUCTION

FGF21 is a hormone involved in metabolic regulation. Pharmacological treatment of animal models of obesity or type II diabetes with FGF21 improves glycemia and triglyceridemia [1]. Moreover, reduced body weight of rodents made obese by high fat diets or as a consequence monogenic genetic alterations has been reported after treatment with FGF21 [1,2]. Most of the effects of FGF21 reducing glycemia are attributed to its effects on adipose tissues enhancing glucose uptake and oxidative metabolism [3,4]. Moreover, FGF21 favors the thermogenic activity of brown adipose tissue and the browning of white fat [5,6], thus promoting energy expenditure; this effect is considered to enhance energy expenditure and contribute to protection against obesity and/or the reduction of glycemia. Recently, central effects of FGF21 have been reported to contribute indirectly to enhanced energy expenditure via induction of sympathetic activity upon adipose tissues [7].

FGF21 is mainly produced by the liver [8] although other tissues such as adipose tissue [9,10], pancreas [11] and even heart synthesize and release to some extent FGF21 [12]. FGF21 produced in adipose tissues and heart has been proposed to play mainly an autocrine role [6,12], although in conditions of high thermogenic activation brown adipose tissue may contribute to the systemic pool of FGF21 [9].

The biological effects of FGF21 require the interaction in the cell surface of FGF receptors, mainly FGFR1 and perhaps FGFR4 also. However, there is also the requirement of the presence of beta-Klotho (KLB), an auxiliary protein totally required for FGF21 to interact with FGFRs and to elicit the intracellular cascade of signaling mediating biological effects in cells [13–16]. FGF15/19, a hormonal factor of intestinal origin, is the only other member of the FGF family that shares with FGF21 the need of KLB to act on target cells [17].

Obesity and type II diabetes are associated with abnormally high levels of FGF21 both in humans and rodent model [18]. It has been proposed that obesity and diabetes constitute states of FGF21 resistance [19] although this proposal is not unanimously agreed. The impaired expression of KLB is suspected to contribute

to such impaired action of FGF21. Elevated levels of FGF21 in obesity and diabetes are associated with abnormally reduced amounts of KLB expression in adipose tissues [20].

KLB expression is up-regulated in adipose cells in association with differentiation and, accordingly, PPAR γ agonists such as rosiglitazone are powerful inducers of KLB gene expression [21]. It has been reported that pro-inflammatory signals, such as TNF α , as well as endoplasmic reticulum stress, repress KLB expression in brown and white adipocytes [22]. This action of pro-inflammatory cytokines is consistent with the reduction in KLB levels observed in obesity [20].

However, we don't know whether KLB levels actually determine the FGF21 action in vivo and to what extent systemic and locally generated FGF21 results in distinct extent in the actions of FGF21. Moreover, KLB levels in vivo may also influence the responsiveness of tissues to FGF15/19 in vivo; in fact, despite the liver is the main target of FGF15/19, several reports indicate that FGF15/19 may act in adipose tissue and promote brown adipose tissue activity [23].

In this study, we sought to determine how KLB levels determine the metabolic regulation and adiposity. For this purpose, we used KLB-null mice, and specially KLB-heterozygote mice, and we determined the effects in vivo and in vitro of total or partial KLB gene ablation.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals

KLB-null mice (B6N/129; IST12954B1) were obtained from Texas A&M Institute for Genomic Medicine and were maintained under a 12 h dark/light cycle with ad libitum access to food (2018 Teklad Global 18% Protein Rodent Diet; Harlan Laboratories) and water. Fgf21-null mice (B6N;129S5-Fgf21^{tm1Lex/Mmcd}) were obtained from the Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC), an NCRR-NIH-funded strain repository, having been donated to the MMRRC by Genentech, Inc. All experiments were performed in accordance with the European Community Council directive 86/609/EEC and were approved by the

Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona. KLB-heterozygote mice were mated and KLB-null, KLB-heterozygote and wild-type littermates were used. 3 month-old mice were maintained as at the standard animal facility temperature (23°C), and others were subjected to acclimatization to cold (10 days at 4°C). After sacrifice, liver, heart, ileum, tibia, interscapular brown adipose tissue (BAT), epididymal adipose tissue (eWAT) and inguinal adipose tissue (iWAT) were dissected and weighed. One piece of adipose tissues was frozen in liquid nitrogen for mRNA and protein extraction, and another piece was placed in 10% buffered formalin overnight and processed for hematoxylin and eosin (H&E) staining and optical microscopy using standard procedures.

2.2. Analytical procedures

Blood glucose and triglyceride levels were determined (Accutrend; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Insulin, leptin, and MCP1 levels were measured using a multiplex system (Millipore; Billerica, MA, USA). FGF21 levels were quantified with ELISA (RD291108200R, Biovendor). The volume of consumed oxygen, the volume of produced carbon dioxide and the respiratory quotient were determined (Harvard Apparatus).

2.3. Adipocyte cultures

Stromal vascular cells were obtained from iBAT and iWAT excised from 3-week-old mice, primary cultures were generated and the cells were induced to differentiate into brown and beige adipocytes, respectively, following the previously reported procedures [24]. Brown adipocyte differentiation was achieved by exposing confluent precursor cells from iBAT in DMEM/F12 medium containing 10% foetal bovine serum and supplemented with 20 nM insulin, 2 nM T3 and 0.1 mM ascorbic acid. For beige cell differentiation, confluent precursor cells from iWAT were maintained in DMEM/F12 containing 10% newborn calf serum. For differentiation, 850 nM insulin, 3 μ M T3, and 35 nM dexamethasone were added. Cells were considered differentiated when >90% cells showed lipid droplets (day 7 for brown adipocytes, day 8 for beige adipocytes). When indicated, differentiated adipocytes were treated with 1 μ M CL-316,243 for 24 hours. Glucose oxidation rates were measured in cultured brown adipocytes.

Cells were incubated for 60 min in the appropriate cell culture medium but containing [¹⁴C]-glucose. Afterwards trapped ¹⁴C-CO₂ was measured. Glycerol levels in culture media were determined using the Free Glycerol Reagent from Sigma-Aldrich (F6428, Sigma-Aldrich).

2.4. RNA isolation and real-time quantitative PCR

RNA from tissues and cells was extracted using a NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), and the levels of mRNA were determined by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), using the corresponding TaqMan probes (Applied Biosystems, Foster City, CA) (See Supplementary Table 2). The mRNA level of each gene of interest was normalized to that of a housekeeping reference gene (18S rRNA) using the comparative ($2^{-\Delta C_t}$) method.

2.5. Western blotting

Cell extracts were prepared by homogenization in a buffer consisting of 20 mM TrisHCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics) and 2 mM sodium orthovanadate and 10 mM β -glycerophosphate as phosphatase inhibitors. Total protein from BAT was isolated by homogenization in a buffer consisting of 50 mM TrisHCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, a protease inhibitor cocktail, 2 mM sodium orthovanadate, and 10 mM β -glycerophosphate. Total protein (30 μ g/lane) was resolved sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 12 or 15% gels and electrotransferred to Immobilon-P PVDF (polyvinylidenedifluoride) membranes (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Membranes were incubated with primary antibodies specific for UCP1 (ab10983, Abcam) or KLB (1:200 sc-74343, Santa Cruz, USA), then with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA), as appropriate. Signals were detected using a chemiluminescence HRP substrate (EMD Millipore). Densitometric analyses of digitalized images were performed using

Multi Gauge V3.0 (Fujifilm) software. Images were processed using Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems) for brightness and contrast adjustments, applied uniformly across the entire image.

2.6. Statistical analysis

We compared the means of the gene expression or protein levels among the three genotypes for KLB (wild type, heterozygous and knock-out) and among the two genotypes for FGF21 using a one-way ANOVA, as well as its post-hoc analyses to assess the differences between groups (wild type vs. heterozygous, wild type vs. homozygous, and heterozygous vs. homozygous) using the Benjamini-Hochberg False Discovery Rate correction. We determined whether there was a linear gradient in the mean values of the gene expression or protein levels between the three genotypes by means of Pearson's tests to calculate *P*-trend values. Student's t-test was performed to check the effect of the incubation with CL-316,243 (in vitro studies) and the effect of cold (in vivo studies) among animals of the same genotype. We accepted any two-sided *P*-value <0.05 as significant. We executed the previously described analyses in R Software, version 3.0.2 (*R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria*).

3. RESULTS

3.1. KLB gene dosage is inversely associated with adiposity

Mice null for KLB gene developed normally, with unaltered growth until adulthood (unchanged tibia length). Body weight was not significantly altered, although tended to be higher in KLB-null mice. Food intake was significantly reduced in KLB-KO mice whereas oxygen consumption rates tended lower in KLB-null mice relative to WT (Table 1). Whereas the weight of liver or heart were unaltered, the size of the two white adipose tissue (WAT) depots analyzed: inguinal (IWAT) as representative of subcutaneous WAT, and epididymal (eWAT) as representative

of visceral WAT, were significantly increased in KLB-null mice relative to wild-type (WT) mice whereas KLB+/- mice showed intermediate levels. There was a strong inverse linear relationship between KLB gene dosage and the size of both iWAT and eWAT depots ($P < 0.05$). The size of iBAT was unaltered (Table 1).

3.2. Reduced KLB gene dosage causes mild alterations in metabolic parameters and the thermogenic responsiveness of BAT

In order to explore the role of KLB levels on BAT, we analyzed mice in basal conditions (room temperature, 23°C) and after thermogenic induction (exposure for 10 days to 4°C ambient temperature). Mice tolerated adaptation to cold and no signs of hypothermia were found. Blood glucose tended higher in KLB-null mice relative to WT in basal and cold-exposed conditions; although the change did not reach statistical significance among individual groups, there was a significant inverse relationship between KLB gene dosage and glucose levels in cold conditions ($P\text{-trend} < 0.05$). Blood triglycerides and plasma insulin did not show significant changes (Table 2). Circulating FGF21 levels were only altered in KLB-null mice in control conditions which showed highly increased levels. In fact, the transcript levels of FGF21 in liver, the main source of circulating FGF21, was up-regulated only in the KLB-null control group (Supplemental Fig S1). Leptin levels were significantly increased in KLB-KO and KLB-HZ mice in control conditions, and, similarly to WAT depot size, showed a significantly negative linear relationship with KLB gene dosage in control conditions (Table 2).

The expression of the KLB protein in iBAT from KLB+/- mice was around one-half that in WT and this difference was maintained in cold exposed mice. Neither microscopy appearance of BAT (Supplemental Fig S2) nor transcript levels of thermogenesis-related genes (Supplemental Table S1) indicated major alterations due to genotype either in basal or cold-stimulated conditions. Adiponectin gene expression was similarly down-regulated in response to cold in the three genotype conditions. Only FGF21 mRNA was significantly higher in KLB-KO mice relative to WT. UCP1 protein levels tended to increase ($P = 0.07$) in response to cold only in WT mice (Fig S2).

3.3. The browning of subcutaneous WAT is impaired in response to reduced KLB gene dosage

As in iBAT, KLB protein and transcript levels in iWAT from Klb^{+/-} mice were around one-half those in iWAT from WT mice (Fig 1A). The analysis of iWAT revealed several alterations according to KLB gene dosage, especially in response to cold. Microscopy examination revealed impaired enrichment in cells of beige morphology (multilocular) in iWAT from KLB-null mice in response to cold, whereas this impairment also occurred, but less intensely, in KLB^{+/-} mice (Fig1B). The expression of most thermogenesis-related genes was impaired in KLB-null mice relative to WT mice after cold stimulation, whereas KLB^{+/-} mice tended to have intermediate levels of impairment (Fig 1C). An analysis of the linear relationship between KLB gene dosage and thermogenesis-related gene expression revealed a significant direct relationship for Ucp1 (P-trend < 0.001), Cox7a1 (P-trend = 0.004), and significant inverse relationship for Fgf21 (P-trend = 0.001) in basal conditions, and inverse relationship for Ucp1 (P-trend = 0.009), Cox7a1 (P-trend = 0.017), and PGC-1 α (P-trend = 0.003) in cold-induced conditions. Most general adipogenesis-related genes were unaltered in the distinct genotypes. However, the mRNA expression of leptin, a marker gene of white-versus-brown phenotype, was significantly higher in iWAT from KLB-null mice relative to WT in both basal conditions. A strong inverse linear relationship between leptin mRNA levels and KLB gene dosage was found both in control and cold-exposed mice (P-trend < 0.001 in both conditions).

The induction of UCP1 protein levels in iWAT, indicative of thermogenic capacity [25] was impaired in KLB-null mice relative to cold-exposed WT mice (Fig 1D).

3.4. Impaired thermogenic activation of beige and brown adipocytes is associated with reduced KLB gene dosage

In order to explore the cell-autonomous role of reduced KLB gene dosage in brown and beige thermogenic activation, brown and beige adipocytes were differentiated in vitro from precursors obtained from iBAT and iWAT depots from mice from the distinct genotypes.

Brown adipocytes acquired unaltered morphological differentiation (lipid droplet accumulation) regardless of the KLB-related genotype (Fig 2A). Accordingly, basal levels of expression of genes involved in general adipogenesis (Fabp4, Pparg) were unaltered in differentiated brown adipocytes (Fig 2C). Moreover, KLB transcript levels remained proportional to gene dosage; absent in KLB-null mice and one-half KLB mRNA levels in KLB+/- mice. The responsiveness of brown adipocytes to induce UCP1 gene expression in response to β 3-adrenergic induction (treatment with CL-316,243) was dramatically impaired in KLB-null cells but not in KLB+/- cells. CL-316,243 repressed the expression of the β 3-adrenoreceptor (Adrb3) as already known [26], but this effect was equal in cells from the distinct genotypes. Similarly to UCP1, FGF21 gene expression was induced by CL-316,243 in WT brown adipocytes and this effect was lower in KLB-/- but not in KLB+/- cells. These differential effects according to cell genotype were concordantly reflected in the CL-316,243-induced release of FGF21 protein to the cell culture medium (Fig 2D). The transcript levels of Egr1 gene, an early marker of FGF21 action, as well as the expression of Glut1, a gene target of FGF21, were significantly reduced in response to CL-316,243 in KLB-null cells and, in this case, KLB+/- cells tended to show intermediate levels of impairment. Finally, lipolytic responsiveness of cells to β 3-adrenergic induction by CL-316,243, measured as the glycerol release to the medium, showed a marked impairment in KLB-HZ cells and an even stronger reduction in KLB-KO cells (Fig 2B).

A parallel analysis was performed for beige adipocytes differentiated in culture from iWAT precursor cells. Similarly to brown adipocytes, morphological differentiation (Fig 3A) and expression of general adipogenic genes were similar in cells from the distinct genotypes, whereas KLB transcript expression was concordant with the genotype gene dosage (Fig 3B). The induction of UCP1 mRNA by CL-316,243 was dramatically impaired in KLB-null cells whereas KLB+/- cells showed significant but intermediate levels of impairment. This was not associated with any difference due to genotype in basal or CL-316.243-impaired levels of β 3-adrenoreceptor (Adrb3) gene expression. The dramatic induction of FGF21 mRNA levels caused by CL-316,243 in WT beige cells was severely impaired in KLB-/- cells but, in this case, KLB+/- cells showed a

response similar to WT cells (Fig 3B). This changes in FGF21 mRNA resulted in totally concordant effects on the FGF21 protein released to the culture medium (Fig 3C). The analysis of Egr1 mRNA and GLUT1 mRNA, targets of FGF21, revealed a total impairment in CL-316,243-mediated induction in KLB-null cells, with no major alteration in KLB+/- cells.

3.5. Lack of FGF21 mimics the lack of thermogenic responsiveness due to reduced KLB gene dosage in beige and brown adipocytes

Data above suggested strongly that the lack of KLB impairs the appropriate autocrine response of cells to the secreted endogenous FGF21. To check this possibility, experiments were performed using brown and beige adipocyte differentiated in culture from FGF21-null mice. Morphological differentiation of brown adipocytes from FGF21-KO mice iBAT precursors was unaltered (Fig 4A). Accordingly, neither the expression of marker genes of overall adipogenesis (Fabp4, Pparg) nor thermogenesis-related genes (Ucp1, Fgf21) were altered in basal conditions (Fig 4C). KLB gene expression was also unaltered in FGF21-KO brown adipocytes. When FGF21-KO brown adipocytes were treated with the β -adrenergic agonist CL-316,243, a dramatic impairment in Ucp1 gene induction (Fig 4C), promotion of glucose oxidation (Fig 4B) and lipolytic activation (glycerol release) (Fig 4D) was found in comparison with WT cells. No such effect was found for the Egr1, and early-response gene to FGF21 (which, otherwise, is not a target of β 3-adrenegic activation). However, the expression of GLUT1 gene, a bona-fide target of FGF21 showed a strong impairment in CL-316,243-mediated induction in FGF21-KO brown adipocytes. We found that KLB gene expression was down-regulated by CL-316,243 treatment but, likewise β 3-adrenergic receptor gene expression, such reduction occurred similarly in FGF21-KO and WT cells.

Similarly to brown adipocytes, there were no alterations in the adipogenic differentiation of cell precursors obtained from FGF21-KO iWAT, according to both morphology (Fig 5A) and transcript gene expression (Fig 5B) in basal conditions. However, the induction of UCP1 mRNA and Glut1 mRNA levels in response to CL-316,243 was significantly reduced in FGF21-KO beige

adipocytes, whereas the expression of AdrB3 gene was unaltered in the distinct genotypes.

4. DISCUSSION

Studies using cellular and animal models of KLB loss-of-function have unequivocally demonstrated that KLB is required for the pharmacological actions of FGF21 in adipose tissue, liver and central nervous system [7,16,27]. However, to what extent the KLB down-regulation occurring in multiple metabolic pathologies, has consequences on metabolic homeostasis and FGF21 action is unclear. Previous studies analyzing KLB-null mice used KLB heterozygotes as controls [16]. That has been of limited value considering that KLB haploinsufficiency results in one half the KLB protein amounts in tissues (current study) which is in fact what happens in disease conditions such as obesity, type II diabetes or lipodystrophy, especially in adipose tissues [20,22,28]. In our study, we used KLB-heterozygotes as a model of reduction of KLB levels at physiological levels, and compared them with mice with total KLB invalidation and wild-type controls.

KLB gene invalidation, either total or partial, did not cause massive changes in systemic metabolites, hormones and cytokines, in accordance with previous observations [7,16,27], although a trend in increased adiposity, hyperleptinemia and hyperglycemia was observed, especially in KLB-KO mice. The increase in FGF21 levels found only in KLB-KO mice, concordant with an induction of FGF21 gene expression in liver, may be interpreted as a reactive compensatory mechanism for the impaired signaling capacity caused by the lowered KLB levels, a situation reminiscent of what happens in obesity and diabetes. Moreover, it suggests that a total impairment in KLB levels are enough to be a primary cause to elicit FGF21 up-regulation. Increased FGF21 levels were associated with enhanced FGF21 expression in the liver, iWAT and IBAT in non-cold stimulated conditions in KLB-null mice and therefore, additionally to an hepatic origin of the increase in FGF21 levels reactive to KLB down-regulation, the contribution of adipose depots cannot be ruled out.

It should be kept in mind that KLB levels does not only determine the responsiveness to FGF21 but also to FGF15 (FGF19 in humans), another endocrine FGF produced in the ileum. Total KLB depletion causes a strong up-regulation in FGF15 expression in ileum, whereas partial KLB suppression does not (Supplemental Fig 3). In fact, in obesity/diabetes, when KLB levels are lowered, circulating FGF19 levels are also lowered [20].

Our results indicate that KLB levels determine the capacity of mice to respond appropriately to thermogenic adaptations in BAT and WAT, although not overt intolerance to cold happens in KLB depletion models. The recruitment of beige cells in WAT is particularly impaired in KLB-depleted mice and partially in KLB-null heterozygotes. The lowered expression of KLB in the central nervous system and its potential consequences on abnormal activation of the sympathetic nervous system in response to cold cannot be ruled out in principle as a mechanisms accounting for the observed effects. However, our cell culture experiments demonstrate the existence of cell autonomous systems for impaired response to β -adrenergic activation in cells devoid of KLB or with half the normal KLB levels. This lack of cellular responsiveness to adrenergic activation does not appear to be associated with changes in β 3-adrenergic receptor expression but essentially to impaired autocrine action of the FGF21 released by brown or beige adipocytes. This possibility is reinforced by the similar pattern of impairment in β 3-adrenergic regulation gene expression and lipolysis in KLB-KO and FGF21-KO cells.

In summary, our study demonstrate that total KLB suppression has strong effects on thermogenic adaptations. However, quantitative reduction in KLB, such as that occurring in KLB-HZ, in a range similar to that elicited by obesity, diabetes or lipodystrophy, may also alter the thermogenic responsiveness of the organism, thus reducing energy expenditure processes and favoring positive energy balance and obesity. We also found that the autocrine action of FGF21 in response to β -adrenergic stimulus is essential for the brown and beige adipocyte response to thermogenic stimulus. Cell autonomous mechanisms in adipocytes intervene in the effects of reduced KLB levels, mainly by impairing the autocrine action of FGF21.

Funding information

This research was supported by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación (grant SAF2014-23636), Fondo de Investigaciones Sanitarias (grants PI14-00063, PI14-00700), co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF). R.M. was supported by PFIS PhD scholarship from AES, ISCIII, MINECO, Spain; T.Q.-L. was supported by a CONACyT (National Council for Science and Technology in Mexico) PhD scholarship.

REFERENCES

- [1] Kharitononkov, A., Shiyanova, T.L., Koester, A., Ford, A.M., Micanovic, R., Galbreath, E.J., et al., 2005. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *Journal of Clinical Investigation* 115(6): 1627–35, Doi: 10.1172/JCI23606.
- [2] Xu, J., Lloyd, D.J., Hale, C., Stanislaus, S., Chen, M., Sivits, G., et al., 2009. FGF21 Reverses Hepatic Steatosis, Increases Energy Expenditure and Improves Insulin Sensitivity in Diet-induced Obese Mice. *Diabetes* 58(January): 250–259, Doi: 10.2337/db08-0392.
- [3] Xu, J., Stanislaus, S., Chinookoswong, N., Lau, Y.Y., Hager, T., Patel, J., et al., 2009. Acute glucose-lowering and insulin-sensitizing action of FGF21 in insulin-resistant mouse models—association with liver and adipose tissue effects. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 297(5): E1105–14, Doi: 10.1152/ajpendo.00348.2009.
- [4] Markan, K.R., Naber, M.C., Ameka, M.K., Anderegg, M.D., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., et al., 2014. Circulating FGF21 Is Liver Derived and Enhances Glucose Uptake During Refeeding and Overfeeding. *Diabetes* 63(12): 4057–63, Doi: 10.2337/db14-0595.
- [5] Hondares, E., Rosell, M., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Iglesias, R., Villarroya, F., 2010. Hepatic FGF21 Expression Is Induced at Birth via PPAR?? in Response to Milk Intake and Contributes to Thermogenic Activation of Neonatal Brown Fat. *Cell Metabolism* 11(3): 206–12, Doi: 10.1016/j.cmet.2010.02.001.
- [6] Fisher, F.F., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E.C., Mepani, R.J., Verdeguer, F., et al., 2012. FGF21 regulates PGC-1?? and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes and Development* 26(3): 271–81, Doi: 10.1101/gad.177857.111.
- [7] Owen, B.M., Ding, X., Morgan, D.A., Coate, K.C., Bookout, A.L., Rahmouni, K., et al., 2014. FGF21 acts centrally to induce sympathetic nerve activity, energy expenditure, and weight loss. *Cell Metabolism* 20(4): 670–7, Doi: 10.1016/j.cmet.2014.07.012.

- [8] Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., Itoh, N., 2000. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* 1492(1): 203–6, Doi: 10.1016/S0167-4781(00)00067-1.
- [9] Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Mampel, T., et al., 2011. Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry* 286(15): 12983–90, Doi: 10.1074/jbc.M110.215889.
- [10] Muise, E.S., Azzolina, B., Kuo, D.W., El-Sherbeini, M., Tan, Y., Yuan, X., et al., 2008. Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and altered metabolic states. *Molecular Pharmacology* 74(2): 403–12, Doi: 10.1124/mol.108.044826.ponectin.
- [11] Wente, W., Efanov, A.M., Brenner, M., Kharitononkov, A., Köster, A., Sandusky, G.E., et al., 2006. Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic beta-cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways. *Diabetes* 55(9): 2470–8, Doi: 10.2337/db05-1435.
- [12] Planavila, A., Redondo, I., Hondares, E., Vinciguerra, M., Munts, C., Iglesias, R., et al., 2013. Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. *Nature Communications* 4: 2019, Doi: 10.1038/ncomms3019.
- [13] Kharitononkov, A., Dunbar, J.D., Bina, H.A., Bright, S., Moyers, J.S., Zhang, C., et al., 2008. FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by β Klotho. *Journal of Cellular Physiology* 215(1): 1–7, Doi: 10.1002/jcp.21357.
- [14] Kurosu, H., Choi, M., Ogawa, Y., Dickson, A.S., Goetz, R., Eliseenkova, A. V., et al., 2007. Tissue-specific Expression of β Klotho and Fibroblast Growth Factor (FGF) Receptor Isoforms Determines Metabolic Activity of FGF19 and FGF21. *Journal of Biological Chemistry* 282(37): 26687–95, Doi: 10.1074/jbc.M704165200.

- [15] Adams, A.C., Cheng, C.C., Coskun, T., Kharitonov, A., 2012. FGF21 Requires β klotho to Act In Vivo. *PLoS ONE* 7(11), Doi: 10.1371/journal.pone.0049977.
- [16] Ding, X., Boney-Montoya, J., Owen, B.M., Bookout, A.L., Coate, K.C., Mangelsdorf, D.J., et al., 2012. β Klotho Is Required for Fibroblast Growth Factor 21 Effects on Growth and Metabolism. *Cell Metabolism* 16(3): 387–93, Doi: 10.1016/j.cmet.2012.08.002.
- [17] Owen, B.M., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., 2015. Tissue-specific actions of the metabolic hormones FGF15/19 and FGF21. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 26(1): 22–9, Doi: 10.1016/j.tem.2014.10.002.
- [18] Zhang, X., Yeung, D.C.Y., Karpisek, M., Stejskal, D., Zhou, Z.G., Liu, F., et al., 2008. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes* 57(5): 1246–53, Doi: 10.2337/db07-1476.
- [19] Fisher, F.M., Chui, P.C., Antonellis, P.J., Bina, H.A., Kharitonov, A., Flier, J.S., et al., 2010. Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes* 59(11): 2781–9, Doi: 10.2337/db10-0193.
- [20] Gallego-Escuredo, J.M., Gómez-Ambrosi, J., Catalan, V., Domingo, P., Giralt, M., Frühbeck, G., et al., 2015. Opposite alterations in FGF21 and FGF19 levels and disturbed expression of the receptor machinery for endocrine FGFs in obese patients. *International Journal of Obesity (2005)* 39(April 2014): 121–9, Doi: 10.1038/ijo.2014.76.
- [21] Wang, H., Qiang, L., Farmer, S.R., 2008. Identification of a domain within peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulating expression of a group of genes containing fibroblast growth factor 21 that are selectively repressed by SIRT1 in adipocytes. *Molecular and Cellular Biology* 28(1): 188–200, Doi: 10.1128/MCB.00992-07.
- [22] Díaz-Delfín, J., Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, M., Caelles, C., Villarroya, F., 2012. TNF- α represses β -klotho expression and impairs FGF21 action in adipose cells: Involvement of JNK1 in the FGF21 pathway. *Endocrinology* 153(9): 4238–45, Doi: 10.1210/en.2012-1193.

- [23] Fu, L., John, L.M., Adams, S.H., Yu, X.X., Tomlinson, E., Renz, M., et al., 2004. Fibroblast growth factor 19 increases metabolic rate and reverses dietary and leptin-deficient diabetes. *Endocrinology* 145(6): 2594–603, Doi: 10.1210/en.2003-1671.
- [24] Quesada-López, T., Cereijo, R., Turatsinze, J.-V., Planavila, A., Cairó, M., Gavalda-Navarro, A., et al., 2016. The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes. *Nature Communications* 7: 13479, Doi: 10.1038/ncomms13479.
- [25] Nedergaard, J., Cannon, B., 2013. UCP1 mRNA does not produce heat. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1831(5): 943–9, Doi: 10.1016/j.bbalip.2013.01.009.
- [26] Bengtsson, T., Cannon, B., Nedergaard, J., 2000. Differential adrenergic regulation of the gene expression of the beta-adrenoceptor subtypes beta1, beta2 and beta3 in brown adipocytes. *The Biochemical Journal* 347 Pt 3(3): 643–51, Doi: 10.1042/0264-6021:3470643.
- [27] Bookout, A.L., de Groot, M.H.M., Owen, B.M., Lee, S., Gautron, L., Lawrence, H.L., et al., 2013. FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system. *Nature Medicine* 19(9): 1147–52, Doi: 10.1038/nm.3249.
- [28] Gallego-Escuredo, J.M., Domingo, P., Gutiérrez, M.D.M., Mateo, M.G., Cabeza, M.C., Fontanet, A., et al., 2012. Reduced levels of serum FGF19 and impaired expression of receptors for endocrine FGFs in adipose tissue from HIV-infected patients. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* (1999) 61(5): 527–34, Doi: 10.1097/QAI.0b013e318271c2c7.

TABLES AND LEGENDS

Table 1. Food intake, oxygen consumption and morphometric parameters in WT, KLB-HZ and KLB-KO mice.

	WT	KLB-HZ	KLB-KO	<i>p</i> - trend
Body weight (g)	27.3 ± 0.7	25.2 ± 1.4	28.2 ± 0.8	0.546
Food intake (g/day)	4.4 ± 0.1	3.8 ± 0.2	3.7 ± 0.2#	0.017
VO2 (ml/min/kg ^{0.75})	33.8 ± 2.9	29.2 ± 4.8	29.1 ± 1.7	0.240
RQ	0.91 ± 0.02	0.89 ± 0.01	0.95 ± 0.02	0.216
Tibia length (T.L.) (mm)	17.4 ± 0.1	16.7 ± 0.4	17.3 ± 0.2	0.747
Liver /T.L. (mg/mm)	71.8 ± 3.4	69.6 ± 2.8	78.2 ± 4.0	0.239
Heart / T.L. (mg/mm)	8.3 ± 0.2	7.4 ± 0.4	7.5 ± 0.3	0.047
iWAT / T.L. (mg/mm)	7.3 ± 1.0	12.8 ± 1.5 #	14.4 ± 1.4##	0.001
eWAT / T.L. (mg/mm)	10.3 ± 1.5	13.8 ± 2.2	20.5 ± 2.1##	0.001
iBAT / T.L. (mg/mm)	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.2	4.1 ± 0.3	0.994

Data are expressed as mean ± SEM of 6 (WT and KLB-KO) or 4 (KLB-HZ) mice. # P < 0.05, ## P < 0.01 for comparison vs WT. Significant P-Trend values (P < 0.05) are shown in bold.

Table 2. Blood glucose and triglyceride levels, and plasma insulin, leptin and FGF21 levels in WT, KLB-HZ and KLB-KO mice exposed to 4 °C ambient temperature for 10 days compared to controls (23 °C).

	WT		KLB-HZ		KLB-KO		<i>p - trend</i>
	C	4°C	C	4°C	C	4°C	
Glucose (mg/dl)	136 ± 4	136 ± 7	150 ± 11	169 ± 7	153 ± 7	175 ± 14	0.014
Triglycerides (mg/dl)	226 ± 21	209 ± 20	208 ± 43	177 ± 21	186 ± 23	180 ± 23	0.339
Insulin (pg/ml)	828 ± 112	911 ± 44	1201 ± 481	664 ± 136	1357 ± 72	802 ± 110	0.499
FGF21 (pg/ml)	244 ± 43	106 ± 24	161 ± 11	273 ± 105	479 ± 75#\$\$	211 ± 42	0.024
Leptin (pg/ml)	666 ± 109	989 ± 280	1237 ± 189#	1099 ± 322	1167 ± 126#	2111 ± 991	0.021

Data are expressed as mean ± SEM of 6 (WT and KLB-KO) or 4 (KLB-HZ) mice. # P < 0.05, for comparison vs WT, \$\$ P < 0.01 for comparison of KLB-KO vs KLB-HZ. Significant P-Trend values (P < 0.05) are shown in bold.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effects of total or partial KLB gene invalidation on iWAT. Analysis of iWAT from three month-old WT, KLB-HZ and KLB-KO male mice exposed to 4°C ambient temperature for 10 days compared to controls (23 °C). **(A)** Representative immunoblot of KLB protein levels (up) and KLB mRNA levels (down). **(B)** Representative optical microscopy images from H&E-stained iWAT (scale bar 100µM). **(C)** Transcript levels of thermogenesis-related and adipogenesis-related genes expressed as fold-change relative to WT in the control condition **(D)** UCP1 protein levels in iWAT (right) and representative UCP1 immunoblot (left). Data are expressed as mean ± SEM of 6 (WT and KLB-KO) or 4 (KLB-HZ) mice. # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 for comparison vs WT. * P < 0.05 and ** P < 0.01 for comparing 4 °C vs C.

Figure 2. Effects of total and partial KLB gene invalidation in brown adipocytes in culture. iBAT precursors from WT, KLB-HZ and KLB-KO mice were differentiated in culture and treated with 1µM CL-316,243 (CL) for 24 hours. **(A)** Representative optical microscopy images of differentiated adipocytes from the three genotypes (Scale bar 200µm). **(B)** Glycerol release. **(C)** Transcript levels in cells, expressed as fold-change relative to the WT, non-treated, condition **(D)** FGF21 protein levels on cell culture media (pg/ml). Data are means ± SEM of 4 independent cultures per genotype condition analyzed in triplicate. ND, non-detectable. # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 for comparison vs WT; \$ P < 0.05, \$\$ P < 0.01 for comparison of KLB-KO vs KLB-HZ. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 for comparing CL (+) vs non treated condition (-).

Figure 3. Effects of total or partial KLB gene invalidation in beige adipocytes in culture. iWAT precursors from wild-type WT, KLB-HZ and KLB-KO mice were differentiated in culture and treated with 1µM CL-316,243 (CL) for 24 hours. **(A)** Representative optical microscopy images of differentiated adipocytes from the three genotypes (Scale bar 200µm). **(B)** Transcript levels, expressed as fold-change relative to the WT, non-treated, condition **(C)** FGF21

protein levels in cell culture media (pg/ml). Data are means + SEM of 4 independent cultures per genotype condition analyzed in triplicate. ND, non-detectable. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ for comparison vs WT; \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$, \$\$\$ $P < 0.001$ for comparison of KLB-KO vs KLB-HZ. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ for comparing CL (+) vs non treated condition (-).

Figure 4. Effects of FGF21 gene invalidation on brown adipocytes in culture. iBAT precursors from wild-type (WT) and FGF21 null (FGF21-KO) mice were differentiated in culture and treated with 1 μ M CL-316,243 (CL) for 24 hours. **(A)** Representative optical microscopy images of differentiated adipocytes from the two genotypes (Scale bar 200 μ m). **(B)** Glucose oxidation rate expressed in disintegrations of $^{14}\text{CO}_2$ per minute (DPM) corrected by DNA amount. **(C)** Transcript levels in cells, expressed as fold-change relative to the WT, non-treated, condition. **(D)** Glycerol release. Data are means \pm SEM of 4 independent cultures per genotype condition analyzed in triplicate. ND, non-detectable. ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ for comparison vs WT. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ for comparing CL (+) vs non treated condition (-).

Figure 5. Effects of FGF21 gene invalidation on beige adipocytes in culture. iWAT precursors from wild-type (WT) and FGF21 null (FGF21-KO) mice were differentiated in culture and treated with 1 μ M CL-316,243 (CL) for 24 hours. **(A)** Representative optical microscopy images of differentiated adipocytes from the two genotypes (Scale bar 200 μ m). **(B)** Transcript levels in cells, expressed as fold-change relative to the WT, non-treated, condition. Data are means \pm SEM of 4 independent cultures per genotype condition analyzed in triplicate. ND, non-detectable. # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ for comparison vs WT. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ for comparing CL (+) vs non treated condition (-).

Figure 1

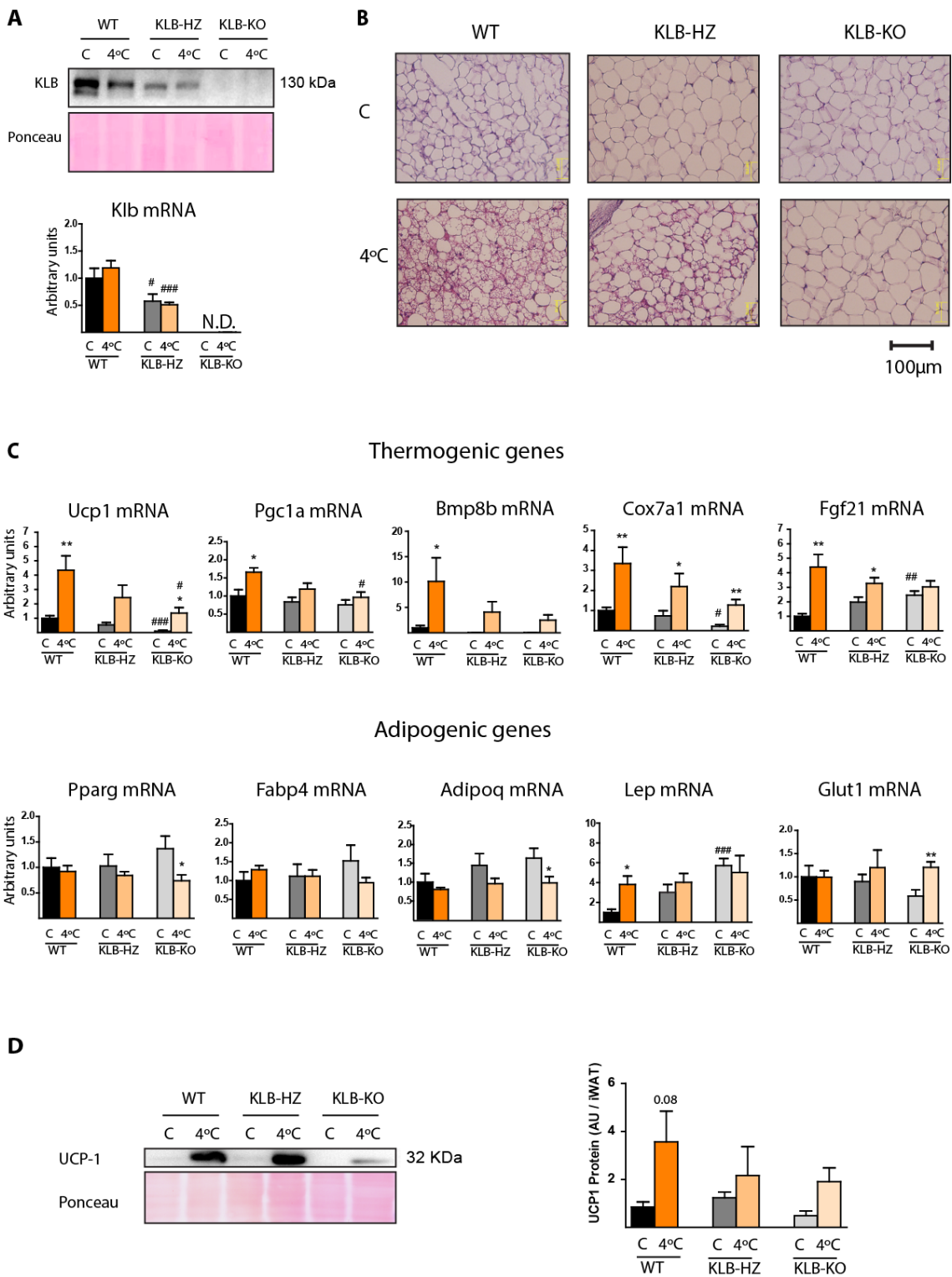


Figure 2

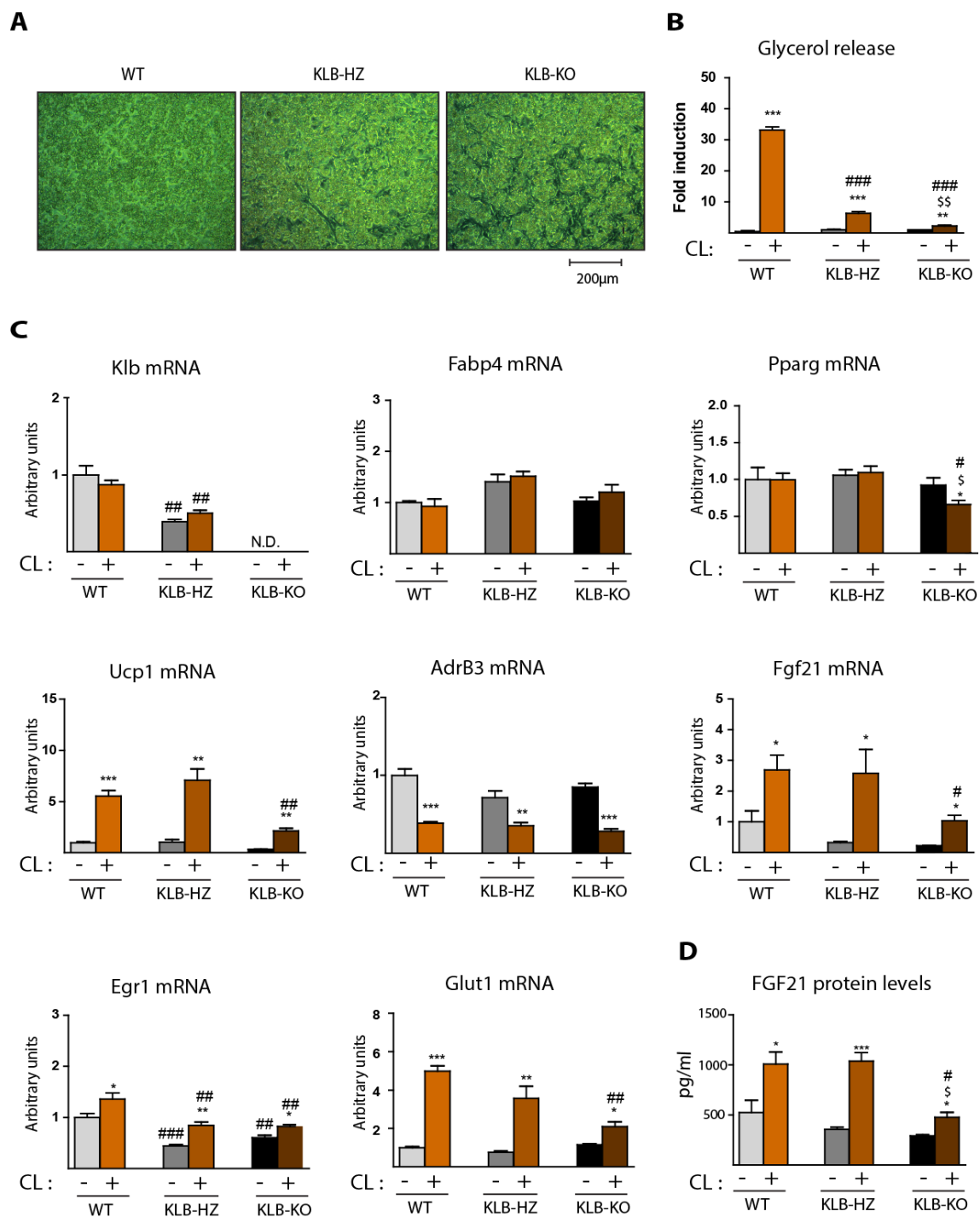
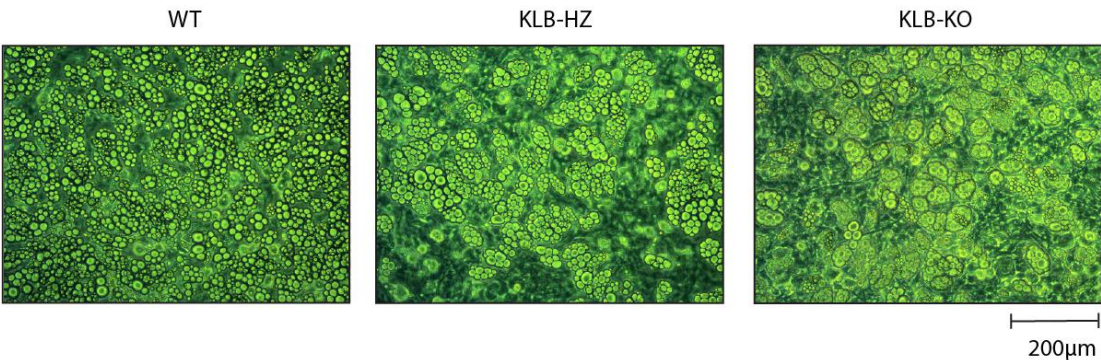
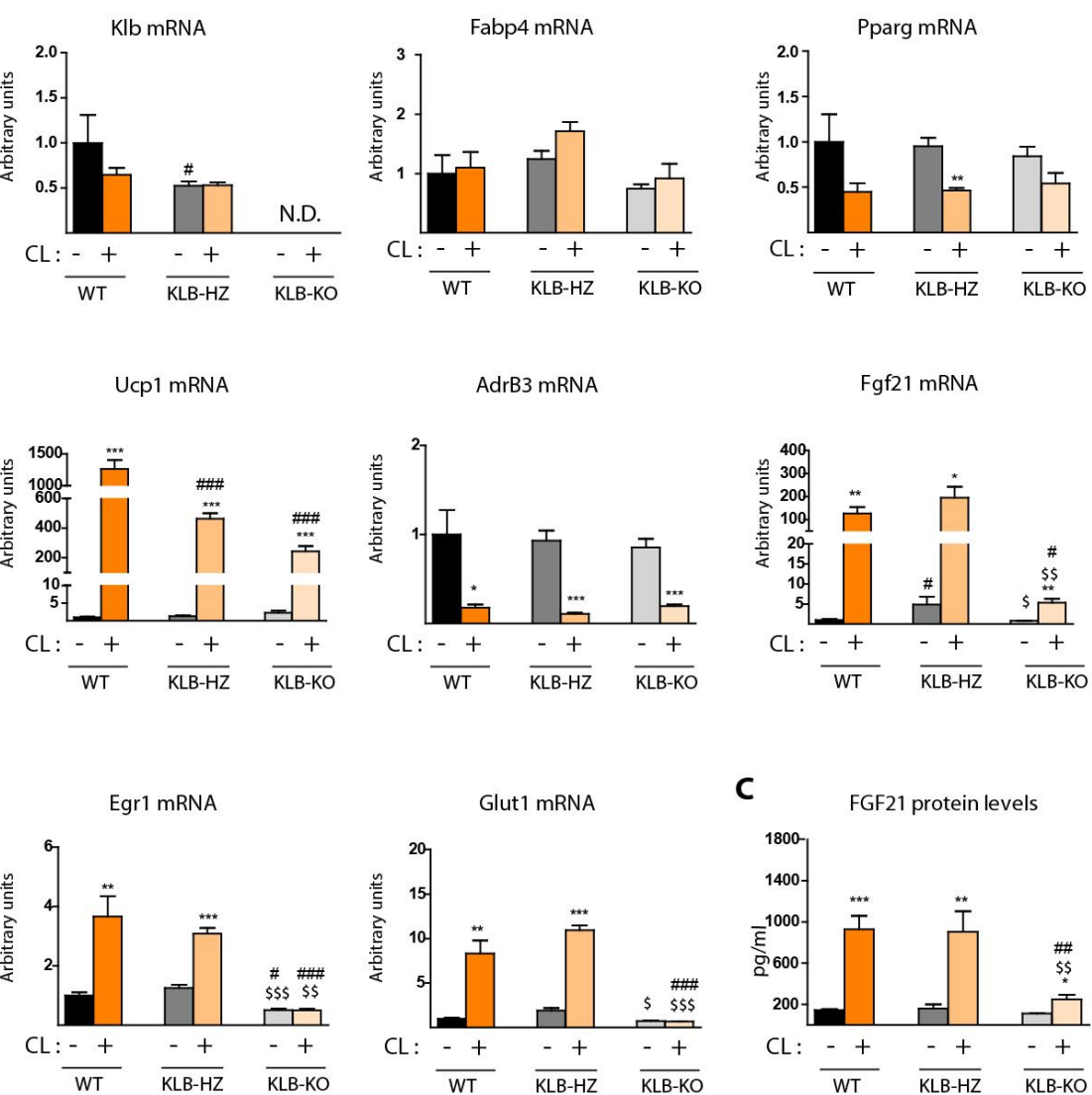


Figure 3

A



B



C

Figure 4

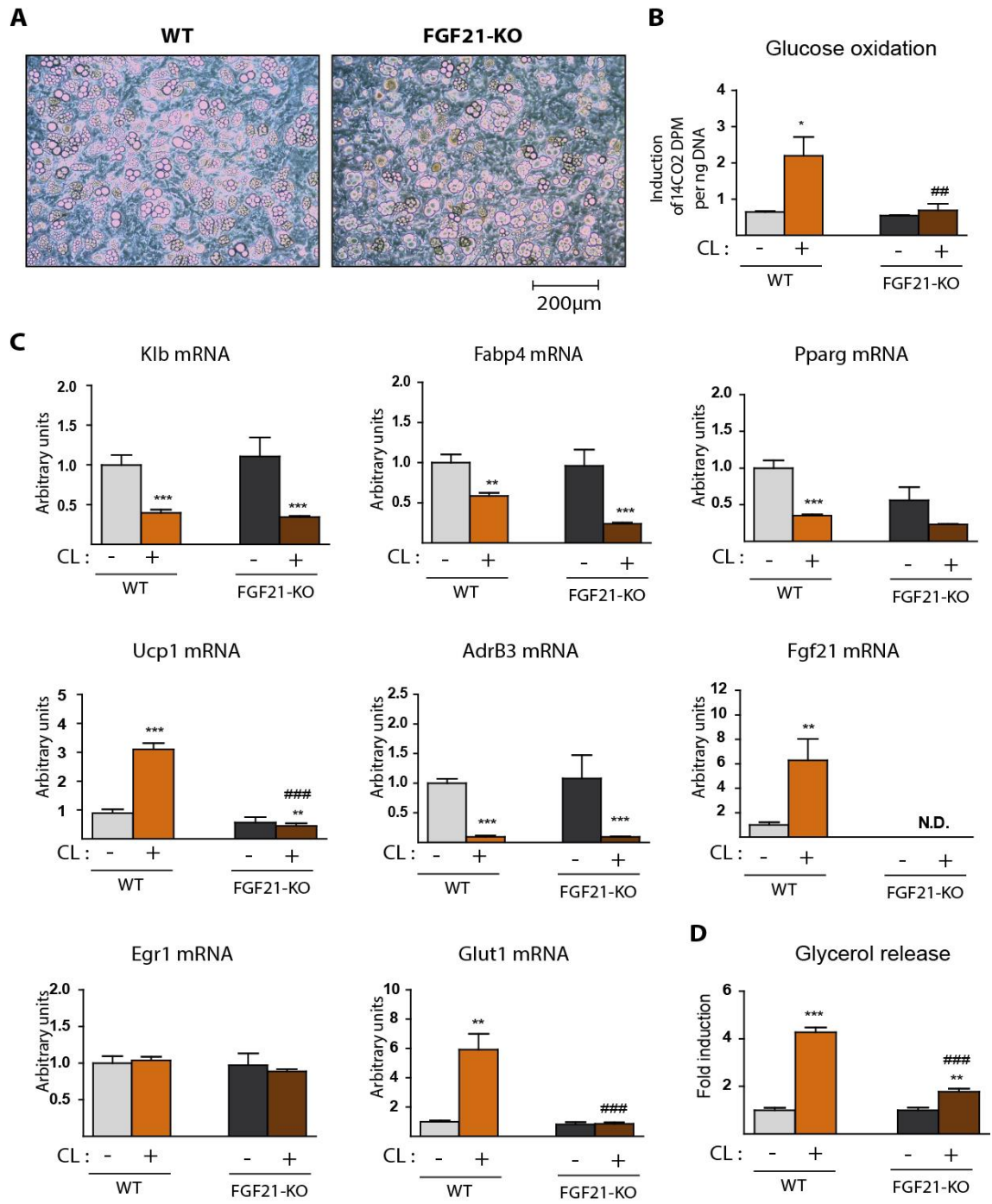
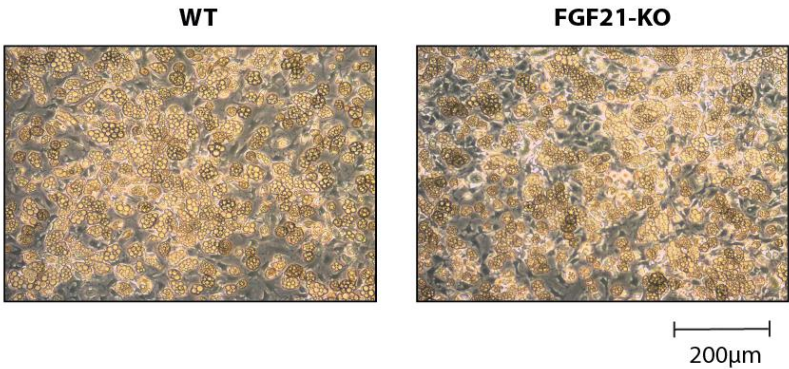
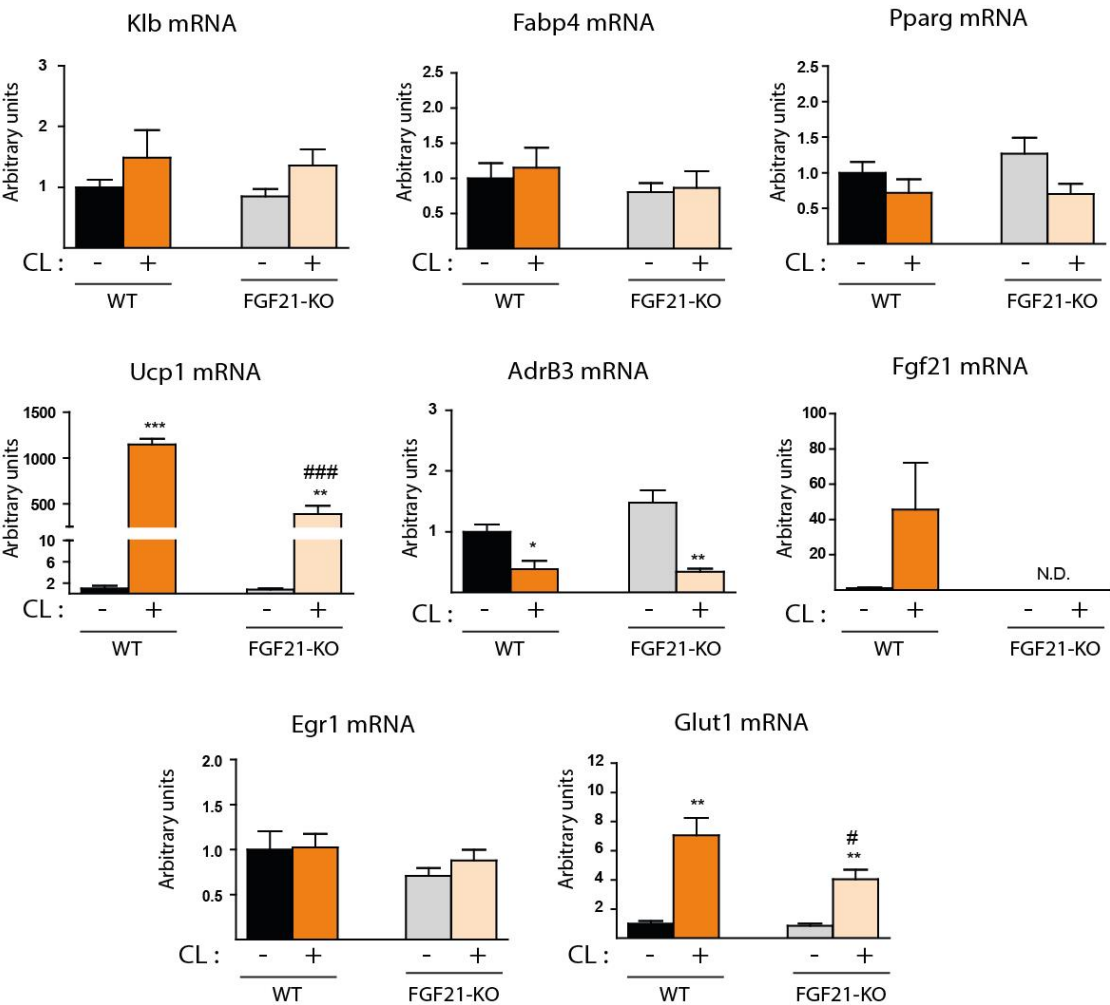


Figure 5

A



B



SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary table S1. Transcript levels in iBAT from WT, KLB-HZ and KLB-KO mice exposed to 4 °C ambient temperature for 10 days compared to controls (23 °C).

	WT			KLB-HZ			KLB-KO			p - trend	
	C	4 °C	C	C	4 °C	C	C	4 °C	C	C	4 °C
Klb	1.00 ± 0.08	0.74 ± 0.07*	0.56 ± 0.10##	0.34 ± 0.03###	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	<0.001	<0.001	<0.001
Ucp1	1.00 ± 0.05	1.41 ± 0.11**	0.98 ± 0.05	1.33 ± 0.17*	0.87 ± 0.05	1.47 ± 0.13**	0.87 ± 0.05	1.47 ± 0.13**	0.785	0.759	0.759
Pgc1a	1.00 ± 0.07	1.01 ± 0.09	1.77 ± 0.33	1.03 ± 0.01	1.33 ± 0.21	1.08 ± 0.11	1.33 ± 0.21	1.08 ± 0.11	0.368	0.570	0.570
Fgf21	1.00 ± 0.12	1.90 ± 0.19**	1.23 ± 0.42	1.82 ± 0.17	2.90 ± 0.69#	3.60 ± 0.46###	2.90 ± 0.69#	3.60 ± 0.46###	0.011	0.004	0.004
Pparg	1.00 ± 0.07	0.76 ± 0.06*	1.25 ± 0.10	0.80 ± 0.13*	1.02 ± 0.06	0.77 ± 0.08*	1.02 ± 0.06	0.77 ± 0.08*	0.859	0.872	0.872
Adipoq	1.00 ± 0.02	0.68 ± 0.05***	1.08 ± 0.09	0.67 ± 0.07*	0.97 ± 0.04	0.66 ± 0.05***	0.97 ± 0.04	0.66 ± 0.05***	0.672	0.821	0.821
Fabp4	1.00 ± 0.09	0.84 ± 0.11	1.00 ± 0.10	0.83 ± 0.10	0.89 ± 0.08	0.88 ± 0.12	0.89 ± 0.08	0.88 ± 0.12	0.402	0.797	0.797
Lep	1.00 ± 0.20	0.83 ± 0.17	2.46 ± 0.32	1.07 ± 0.36	1.18 ± 0.75	1.13 ± 0.32	1.18 ± 0.75	1.13 ± 0.32	0.050	0.409	0.409
Glut1	1.00 ± 0.14	1.19 ± 0.07	1.25 ± 0.13	1.06 ± 0.03	1.04 ± 0.23	1.27 ± 0.05#	1.04 ± 0.23	1.27 ± 0.05#	0.859	0.403	0.403
Cox7a1	1.00 ± 0.08	1.04 ± 0.07	0.93 ± 0.09	1.13 ± 0.13	0.93 ± 0.04	1.35 ± 0.12*	0.93 ± 0.04	1.35 ± 0.12*	0.451	0.038	0.038

Data are expressed as mean ± SEM of 6 (WT and KLB-KO) or 4 (KLB-HZ) mice and are expressed as fold-change relative to WT-C values. ND, non-detectable. # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 for comparison vs WT. \$ P < 0.05, \$\$ P < 0.01, \$\$\$ P < 0.001 for comparison of KLB-KO vs KLB-HZ. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 for comparing 4 °C vs C. Significant P-Trend values (P < 0.05) are shown in bold.

Supplementary Table S2. TaqMan probes (Applied Biosystems) used for RT-PCR quantification of gene transcripts.

GENE	REFERENCE
18S rRNA	Hs99999901_s1
FGF21	Mm00840165_g1
Klb	Mm00473122_m1
PGC-1alpha	Mm00447183_m1
UCP1	Mm00494069_m1
Glut1	Mm00441480_m1
Bmp8b	Mm00432115_g1
Cox7a1	Mm00438296_m1
AdrB3	Mm02601819_g1
PPARg	Mm00440945_m1
FABP4	Mm00445880_m1
Leptin	Mm00434759_m1
AdipoQ	Mm00456425_m1
Egr1	Mm00656724_m1
Fgf15	Mm00433278_m1

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Fig 1. Effects of total or partial KLB gene invalidation on the expression of the FGF21 and KLB genes in liver. Analysis of liver samples from three month-old WT, KLB-HZ and KLB-KO male mice exposed to 4°C environmental temperature for 10 days compared to controls (23 °C). Transcript levels are expressed as fold-change relative to WT in the control condition. Data are expressed as mean ± SEM of 6 (WT and KLB-KO) or 4 (KLB-HZ) mice and are expressed as fold-change relative to WT-C values. **##** $P < 0.01$, for comparison vs WT. **\$** $P < 0.05$ for comparison of KLB-KO vs KLB-HZ. ****** $P < 0.01$ for comparing 4 °C vs C.

Supplementary Fig 2. Effects of total or partial KLB gene invalidation on iBAT. iBAT from three month-old WT, KLB-HZ and KLB-KO male mice exposed to 4°C environmental temperature for 10 days compared to controls (23 °C). **(A)** Representative immunoblot of KLB protein levels (left) and KLB mRNA levels (right) expressed as fold-change relative to WT in the control condition. **(B)** Representative optical microscopy images from H&E-stained iBAT (scale bar 100µM). **(C)** UCP1 protein levels in iBAT. Data are expressed as mean ± SEM of 6 (WT and KLB-KO) or 4 (KLB-HZ). **#** $P < 0.05$, **##** $P < 0.01$, **###** $P < 0.001$ for comparison vs WT. ***** $P < 0.05$ for comparing 4 °C vs C.

Supplementary Fig 3. Effects of total or partial KLB gene invalidation on the expression of FGF15 and KLB in ileum. Action of cold exposure. Analysis of ileum samples from three month-old WT, KLB-HZ and KLB-KO male mice exposed to 4°C environmental temperature for 10 days compared to controls (23 °C). Transcript levels are expressed as fold-change relative to WT in the control condition. Data are expressed as mean ± SEM of 6 (WT and KLB-KO) or 4 (KLB-HZ) mice and are expressed as fold-change relative to WT-C values. **##** $P < 0.01$, for comparison vs WT. **\$\$** $P < 0.01$ for comparison of KLB-KO vs KLB-HZ. **.*** $P < 0.05$, ****** $P < 0.01$ for comparing 4 °C vs C.

SUPPLEMENTARY FIGURES

Figure S1

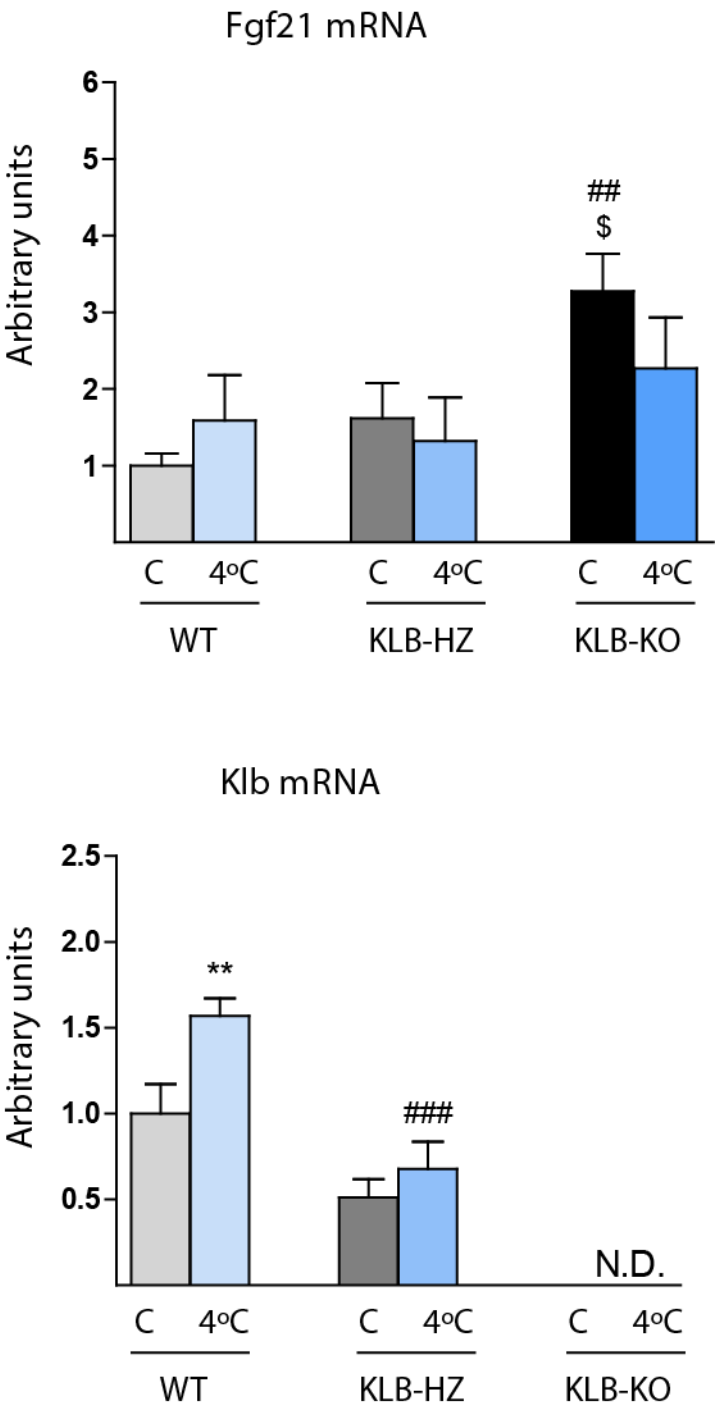


Figure S2

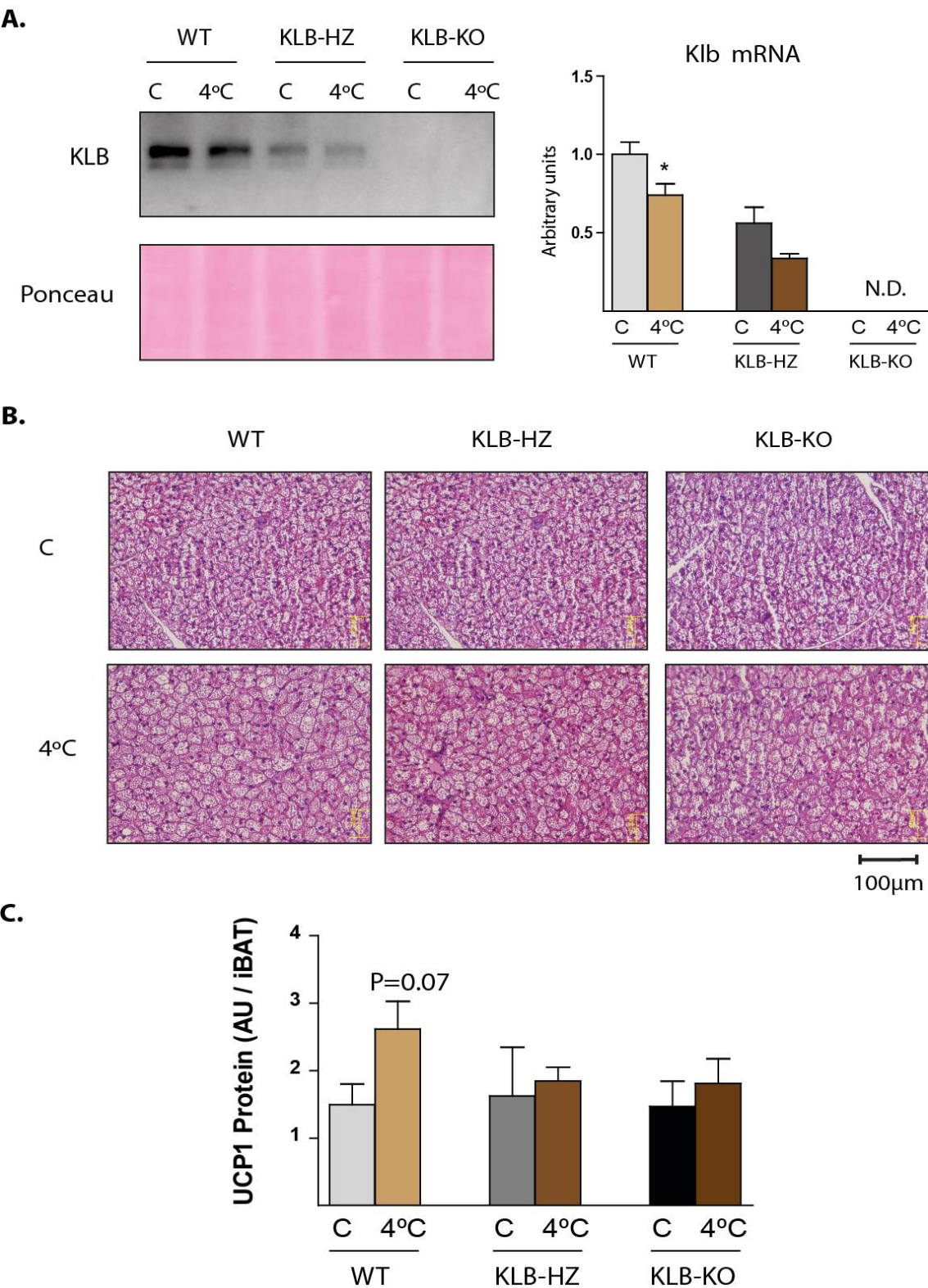
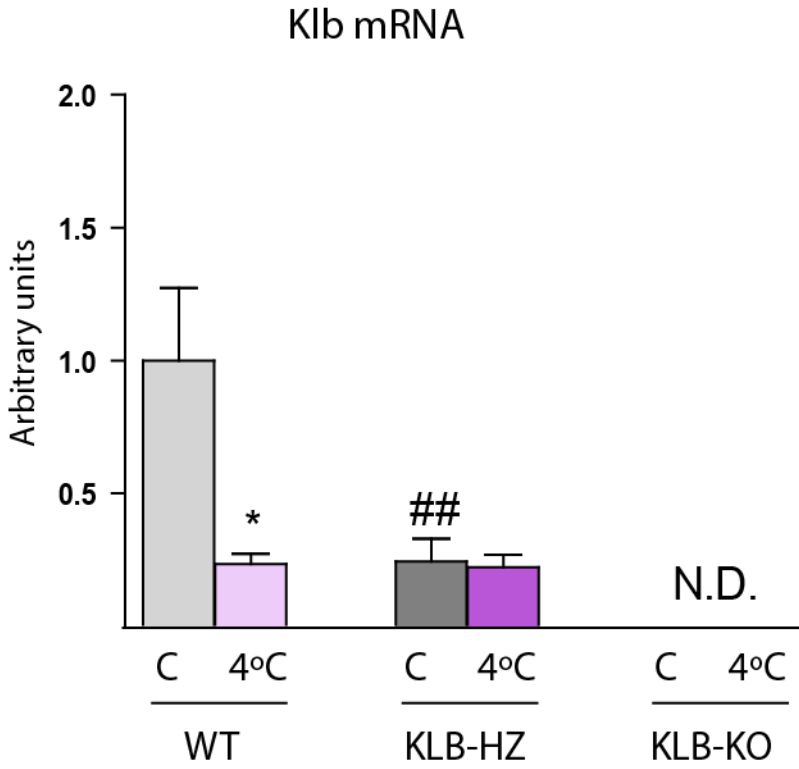
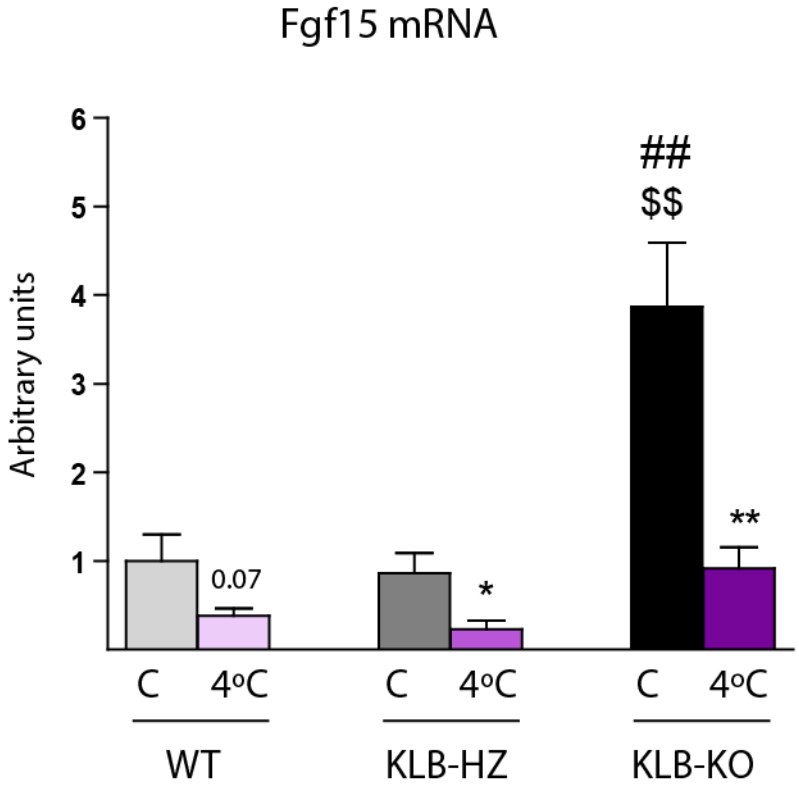


Figure S3



The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes

Revista: Nature Communications

PMID: 27853148

Título: *El sensor de lípidos GPR120 promueve la activación del tejido adiposo marrón y la liberación de FGF21 por parte de los adipocitos.*

Resumen: La actividad termogénica del tejido adiposo marrón y el del *beige/brite* son componentes muy importantes del gasto energético global del organismo, es por eso que se investigan como posibles dianas terapéuticas para tratar dolencias como la obesidad y la diabetes tipo II. En este trabajo mostramos como el receptor de ácidos grasos poliinsaturados GPR120 es capaz de activar el programa termogénico del tejido adiposo. Mediante un estudio de secuenciación del transcriptoma (*RNA-Seq*) del tejido adiposo marrón de ratones expuestos al frío, observamos que GPR120 es inducido durante la activación del programa termogénico. También encontramos que la activación de GPR120 en ratones promueve la activación de su adiposo marrón y el *browning* de su adiposo blanco. Por el contrario, la exposición al frío de ratones deficitarios para el gen que codifica GPR120 produce una activación del adiposo marrón y unos niveles de *browning* menores que en animales *wild type*. La activación de GPR120 produce la liberación de FGF21 por parte del tejido adiposo beige y marrón de los ratones, además aumenta sus niveles de FGF21. Pero, además, FGF21 es necesario para que la activación de GPR120 induzca la actividad termogénica del tejido adiposo beige y marrón, lo que indica que FGF21 actúa como intermediario en este proceso.

ARTICLE

Received 15 Feb 2016 | Accepted 7 Oct 2016 | Published 17 Nov 2016

DOI: 10.1038/ncomms13479

OPEN

The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes

Tania Quesada-López¹, Rubén Cereijo¹, Jean-Valéry Turatsinze², Anna Planavila¹, Montserrat Cairó¹, Aleix Gavalda-Navarro¹, Marion Peyrou¹, Ricardo Moure¹, Roser Iglesias¹, Marta Giralt¹, Decio L. Eizirik² & Francesc Villarroya¹

The thermogenic activity of brown adipose tissue (BAT) and browning of white adipose tissue are important components of energy expenditure. Here we show that GPR120, a receptor for polyunsaturated fatty acids, promotes brown fat activation. Using RNA-seq to analyse mouse BAT transcriptome, we find that the gene encoding GPR120 is induced by thermogenic activation. We further show that GPR120 activation induces BAT activity and promotes the browning of white fat in mice, whereas GPR120-null mice show impaired cold-induced browning. Omega-3 polyunsaturated fatty acids induce brown and beige adipocyte differentiation and thermogenic activation, and these effects require GPR120. GPR120 activation induces the release of fibroblast growth factor-21 (FGF21) by brown and beige adipocytes, and increases blood FGF21 levels. The effects of GPR120 activation on BAT activation and browning are impaired in FGF21-null mice and cells. Thus, the lipid sensor GPR120 activates brown fat via a mechanism that involves induction of FGF21.

¹Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular, Institut de Biomedicina, Universitat de Barcelona (IBUB) and CIBER Fisiopatologia de la Obesidad y Nutrición, Avda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain. ²ULB Center for Diabetes Research, Medical Faculty, Université Libre de Bruxelles, Avenue Franklin Roosevelt 50, 1050 Brussels, Belgium. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.V. (email: fvillarroya@ub.edu).

Brown adipose tissue (BAT) is the main site of non-shivering thermogenesis in mammals. It confers a unique mechanism for energy expenditure and heat production in response to cold and provides a protective mechanism against excessive body weight accumulation in response to overfeeding^{1,2}. The interest in brown fat activity as a mechanism of protection against the obesity and metabolic diseases has been renewed by the recent recognition that adult humans possess active BAT, and its activity is negatively associated with obesity and type II diabetes³. Many aspects of the molecular mechanisms underlying the function of BAT are known, but we do not comprehensively understand how BAT activity is controlled and integrated with whole organism metabolism to ensure that metabolic substrates are burned and heat is provided. Recent studies unravelled an additional BAT-related means to control energy expenditure, wherein white adipose tissue (WAT) has the capacity to acquire BAT-like properties via the so-called 'browning' process. During this process, sustained thermogenic activation leads to the appearance of the so-called beige or brite adipocytes in WAT depots, which, like classical brown adipocytes, express uncoupling protein-1 (UCP1) and perform uncoupled mitochondrial respiration^{4,5}. Several lines of evidence suggest that the browning process is especially relevant in controlling whole-body energy balance⁴. This may reflect its high inducibility in response to environmental factors and the ability of beige cells to use additional, non-UCP1-mediated energy expending mechanisms⁶.

Studies aimed at assessing how BAT responds to cold can improve our understanding of the processes that mediate BAT activation. Transcriptomic profiling of BAT from cold-exposed mice can provide a snapshot of how BAT responds to the thermogenic activation and may offer an unbiased look at novel BAT activity-related actors. Recently, RNA sequencing (RNA-seq) has emerged as the best tool for transcriptomic studies, as it does not require *a priori* knowledge of targets, and shows both high reproducibility and a low frequency of false positives^{7–9}. Moreover, RNA-seq can identify 25–75% more genes than complementary DNA (cDNA) microarrays, and it allows assessment of both whole genes and splice variants^{10,11}.

Here we used RNA-seq to analyse the responsiveness of BAT to the cold-induced thermogenic activation. Departing from these data set, we identified a novel pathway through which thermogenic activation of BAT and the browning of WAT occur via the activation of GPR120 (*FFAR4*). GPR120 is a G-protein-coupled receptor that binds unsaturated long-chain fatty acids and their derivatives¹². GPR120 is known to contribute to mediating the anti-inflammatory actions of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and in protecting against obesity and type II diabetes^{13,14}. Here we identify a novel pathway of thermogenic regulation through that PUFA-mediated GPR120 activation induces BAT activity and WAT browning via the hormonal factor fibroblast growth factor-21 (FGF21).

Results

Effect of cold exposure on BAT transcriptome. RNA-seq data were obtained from BAT samples obtained from mice housed under thermoneutral conditions or following a 24-h exposure to 4 °C. Among the 21,391 genes detected by the RNA-seq as being 'expressed' (RPKM > 0) a total of 3,470 (16.2%) were significantly modified under the cold condition: 2,498 and 972 were upregulated and downregulated, respectively. To validate our analysis and identify novel candidate genes related to the thermogenic activation in BAT, the top 10% most cold-induced genes were arbitrarily selected for manually curated analysis. Most were already known to be upregulated by cold; these

included key components of mitochondrial uncoupling (*UCP1*, 4.5-fold induction), lipid metabolism (*Elovl3*, 9.9-fold induction; and *glycerokinase*, 5.4-fold induction), intracellular regulation (*Dio2*, 4.8-fold induction; and *PGC-1 α* , 3.3-fold induction) and extracellular regulation (*Bmp8b* and *FGF21*, > 10-fold inductions). Among the top-induced genes that had not been previously studied, we focused on *FFAR4* (GPR120). This G-protein-coupled receptor binds unsaturated long-chain fatty acids and their derivatives, and has been proposed to mediate multiple metabolic effects, including anti-inflammation and amelioration of insulin resistance^{12,13}. Allelic variants causing loss-of-function put human individuals at risk to develop obesity¹⁴. A comparison of our RNA-seq data with two microarray-based data sets^{7,8} and a digital gene expression profiling¹⁵ revealed that GPR120 was consistently and strongly upregulated in BAT following cold exposure. Here we set out to assess the regulation and function of GPR120 in relation to BAT activation.

Thermogenic activation upregulates GPR120 in fat depots. The expression of *GPR120* transcript was determined in adipose depots from mice reared at 21 °C in comparison with small intestine and colon that express functional levels of *GPR120* (refs 16,17). The highest expression was found in interscapular BAT (iBAT), while specific WAT depots (inguinal, iWAT; epididymal, eWAT; and mesenteric WAT) showed lower but still relevant expression (Fig. 1a; Supplementary Fig. 1). The expression of *GPR120* messenger RNA (mRNA) was strongly induced in BAT of mice subjected to either short- or long-term cold exposure (Fig. 1b). Cold also induced *GPR120* mRNA expression in iWAT. GPR120 protein levels were increased in both BAT and iWAT after cold exposure (Fig. 1b).

Similar to markers of brown adipocyte thermogenic activity (for example, *UCP1*), *GPR120* was preferentially expressed in mature, differentiated, brown adipocytes rather than in the stromal vascular fraction (Fig. 1c).

In cultured precursor cells from iBAT, *GPR120* expression was low at the pre-adipocyte stage, increased progressively during brown adipocyte differentiation and peaked at full differentiation (day 10, maximal expression of *UCP1*; (Fig. 1d). Norepinephrine or cyclic AMP (cAMP), the major mediators of thermogenic induction, significantly upregulated GPR120 transcript (Fig. 1e) and protein levels (Fig. 1f) in brown adipocytes. The effects of norepinephrine (NE) and cAMP were blunted by the p38 MAPK inhibitor SB202190, but not by the protein kinase-A (PKA) inhibitor H89 (Fig. 1g). This contrasts with *UCP1* mRNA whose induction by NE and cAMP was partially blunted both by SB202190 and H89, in accordance with the dual involvement of p38 MAPK and PKA in the control of *UCP1* gene expression¹⁸ (Supplementary Fig. 1). GW7647, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) activator, did not significantly alter *GPR120* expression (Fig. 1g).

In summary, we herein identified GPR120 as a novel component of the acquisition of the differentiated phenotype of brown adipocytes and showed that it is induced *in vivo* and *in vitro* in BAT by noradrenergic regulators of thermogenic activation.

GW9508 increases the thermogenic activity of BAT and WAT. Mice were treated with GW9508, an activator of GPR120, via their food during 7 days. This treatment did not significantly modify body weight or food intake. Metabolic profiling revealed unaltered glycaemia and triglyceridemia, but GW9508 induced a reduction in insulin levels (Supplementary Table 1), which could reflect improvement in insulin sensitivity. The other tested hormone levels were unaltered following GW9508 treatment

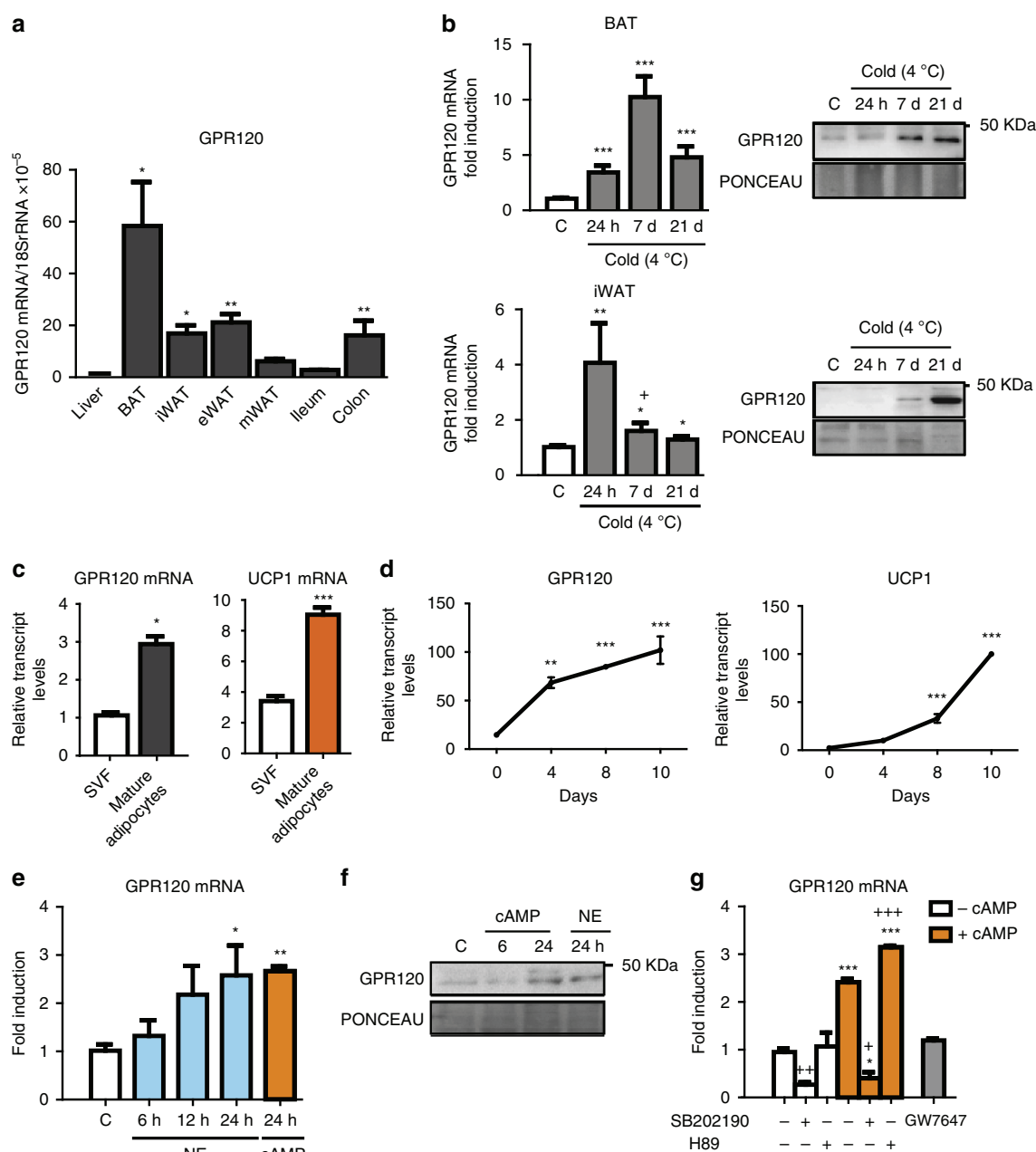


Figure 1 | Regulation of GPR120 gene expression in BAT and brown adipocytes. For **a**, **b**, tissues from adult mice were analysed. **(a)** Relative expression of *GPR120* mRNA in liver, BAT, iWAT, eWAT, mWAT, ileum and colon ($n = 4$) was quantified. **(b)** *GPR120* mRNA expression in BAT and iWAT from adult mice maintained at thermoneutrality (29 °C) or exposed to cold (4 °C) for 24 h, 7 days and 21 days ($n = 5$) in the left, representative immunoblot of three independent assays of the relative changes of *GPR120* protein, in the right. **(c)** mRNA levels of *GPR120* and *UCP1* in the stromal vascular fraction (SVF) and mature adipocytes obtained from iBAT ($n = 3$). For **d**–**g**, BAT precursor cells were differentiated. **(d)** mRNA expression patterns for *GPR120* and *UCP1* during brown adipocyte differentiation in primary cultures, as assessed at days 0 (pre-adipocytes) 4, 8, and 10 ($n = 3$). **(e)** *GPR120* mRNA levels in differentiated brown adipocytes treated with 0.5 μ M norepinephrine (NE) for 6, 12 and 24 h (blue bars) or with 1 mM dibutyryl-cAMP for 24 h (orange bars; $n = 4$). **(f)** Representative immunoblot of three independent assays of the relative changes of *GPR120* protein levels in response to the indicated NE and cAMP treatments. **(g)** Effects of 10 μ M SB202190 (a p38 MAPK inhibitor), or 20 μ M H89 (a PKA inhibitor) on the upregulation of *GPR120* mRNA in response to 1 mM dibutyryl-cAMP (orange bars), and effects of 1 μ M GW7647 (PPAR α agonist, grey bar; $n = 4$). Bars are means \pm s.e.m. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared with corresponding controls, or ileum; + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$, +++ $P < 0.001$ for the effects of SB202190 or H89; for **a**, **b**, **e** and **g** analysis of variance with Tukey's *post hoc* test was used; for **c** and **d** two-tailed unpaired Student's *t*-test was performed).

(Supplementary Table 1) with the exception of FGF21 levels, which were markedly induced (see below). The 1-week exposure to GW9508 treatment did not significantly modify the gross masses of iBAT, iWAT, eWAT or mesenteric WAT (Supplementary Table 1). Gene expression analysis revealed significant upregulations among markers of thermogenic activation

in BAT, such as *UCP1*, *PGC-1 α* , *CoxIV* and *Sirt3*, as well as *Glut1*, but no change in overall adipogenesis. (Fig. 2a). *UCP1* protein levels in the iBAT depot were also significantly increased (Fig. 2a). Microscopy examination of iBAT did not reveal major changes (Fig. 2a). In iWAT, we observed strong evidence of GW9508-induced browning, including upregulation of markers of brown-

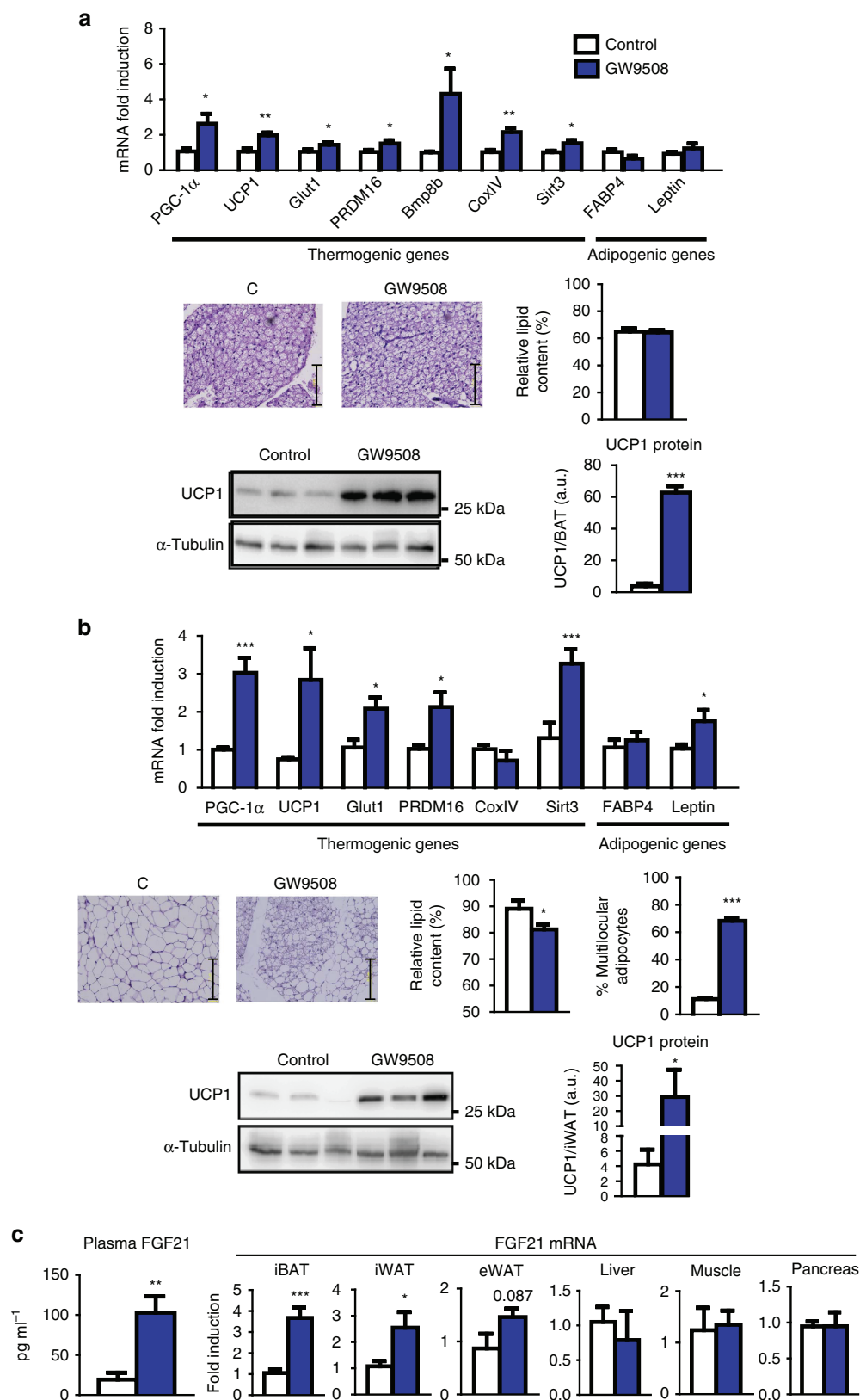


Figure 2 | GW9508 upregulates thermogenic genes in iBAT and browning in iWAT while inducing FGF21 expression and release. Adult mice were fed for 7 days a control diet (white bars) or a diet supplemented with GW9508 (blue bars; $n = 6$). **(a)** Relative expression levels of thermogenic and adipogenic genes in iBAT, representative optical microscopy images from H&E-stained iBAT (scale bar, 125 μ m), relative lipid content, UCP1 protein levels and representative UCP1 immunoblot. **(b)** Relative expression levels of thermogenic and adipogenic genes in iWAT, representative optical microscopy from H&E-stained iWAT (scale bar, 125 μ m), relative lipid content, percentage of multilocular adipocytes, UCP1 protein levels and representative UCP1 immunoblot. **(c)** Circulating levels of FGF21 protein and *FGF21* mRNA expression levels in iBAT, iWAT, eWAT, liver, skeletal muscle and pancreas. Bars are means \pm s.e.m. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ relative to untreated control mice; two-tailed unpaired Student's t -test).

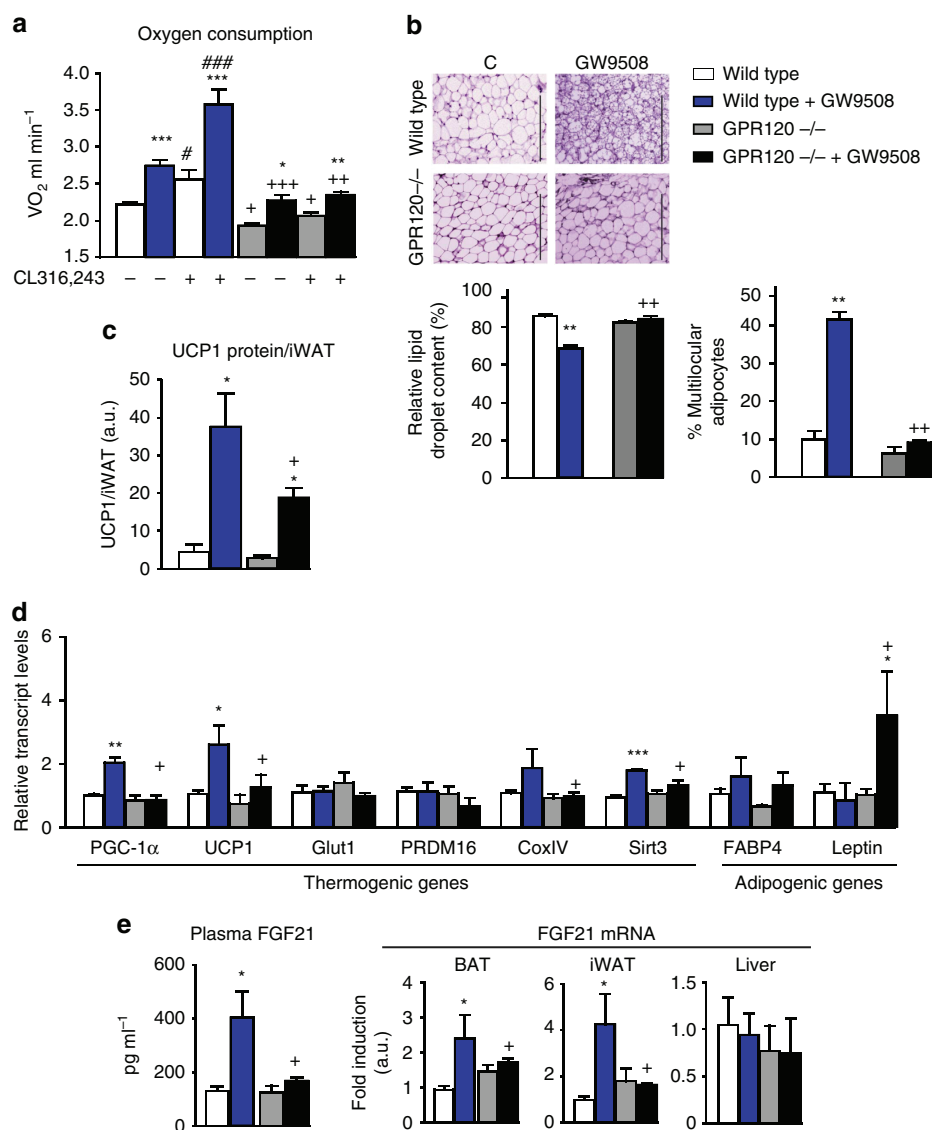


Figure 3 | GPR120 gene invalidation blunts the effects of GW9508 on adipose tissues and systemic FGF21 levels. Wild-type and *GPR120*^{-/-} mice were fed a control diet (white and grey bars, respectively) or a diet supplemented with GW9508 (blue and black bars, respectively) for 7 days ($n=5$ per group). **(a)** Oxygen consumption in basal conditions and after CL316,243 injection. **(b)** Representative optical microscopy from H&E-stained iWAT (scale bar, 200 μm), relative lipid content and percentage of multilocular adipocytes. **(c)** UCP1 protein levels in iWAT. **(d)** Relative expression levels of thermogenic and adipogenic genes in iWAT. **(e)** Circulating levels of FGF21 protein and *FGF21* mRNA expression levels in iBAT, iWAT and liver. Bars are means \pm s.e.m. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ relative to untreated control mice of each genotype; + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ and +++ $P < 0.001$ for the comparisons between genotypes under same GW9508 treatment status; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ for the effects of GW9508 treatment; analysis of variance with Tukey's *post hoc* test).

related thermogenesis (*UCP1*, *PGC-1 α* and *Sirt3*), and the beige adipogenesis-related gene *PRDM16* (Fig. 2b). Consistent with these data, GW9508-treated mice exhibited multiple multilocular adipocytes in iWAT, which are typically associated with the browning process (Fig. 2b). UCP1 protein levels in iWAT were significantly induced by GW9508 (Fig. 2b). Epididymal WAT showed some signs of browning, such as upregulation of *UCP1*, *PGC-1 α* and *Sirt3*, but no multilocular beige adipocytes (Supplementary Fig. 2).

As FGF21 is induced in association with the thermogenic activation of BAT and browning of WAT^{19,20}, we examined FGF21 in treated mice. We found that circulating levels of FGF21 were strongly increased in GW9508-treated mice, as were the *FGF21* mRNA expression levels in BAT and iWAT (Fig. 2c), but not in other tissues such as liver, skeletal muscle or pancreas. The

lack of effects of GW9508 treatment on hepatic *FGF21* gene expression suggested that the upregulation of circulatory FGF21, following GW9508 treatment was not due to a hepatic effect. In addition to activating GPR120, GW9508 can activate another G-protein-coupled receptor, GPR40, which is expressed in the intestine²¹ but absent in adipose tissues and minimally expressed in hepatic cells^{17,22}. Accordingly, GPR40 transcript expression was undetectable in BAT and most WAT depots (Supplementary Fig. 3a). Moreover, the intestine does not express FGF21 under basal conditions²³ or following GW9508 treatment (Supplementary Fig. 3b). The glucagon gene (encoding glucagon-like peptide (GLP)-1), a target of GPR120 in the intestine²¹, was not altered by GW9508 treatment (Supplementary Fig. 3b). These results indicate that GW9508 treatment has only minor intestinal effects under this experimental setting.

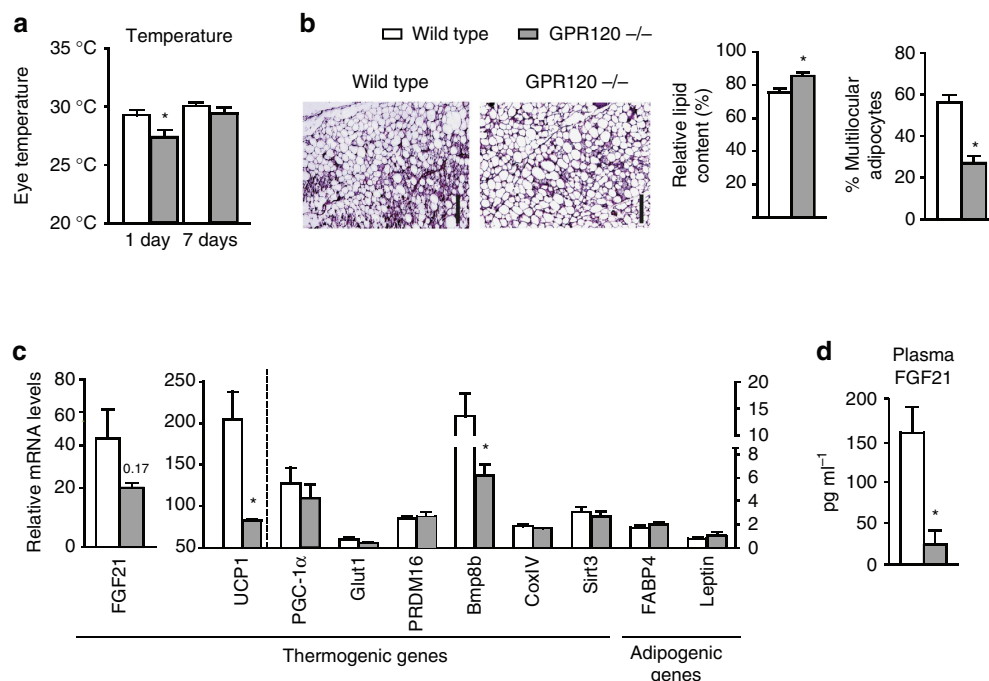


Figure 4 | GPR120 gene invalidation compromises thermoregulation and iWAT browning in association with a reduction in FGF21 levels.

Wild-type (Wt, white bars) mice and *GPR120*^{-/-} mice (grey bars) mice were exposed to cold (4 °C) for 7 days (*n* = 5). **(a)** Body temperature on days 1 and 7 of cold exposure. **(b)** Representative images of H&E-stained iWAT (scale bar, 200 μ m), the relative lipid droplet content, and the percentage of multilocular adipocytes. **(c)** Relative expression levels of thermogenic and adipogenic genes in iWAT. **(d)** Circulating levels of FGF21. Bars are means + s.e.m. (**P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001 relative to wild-type animals exposed to cold; two-tailed unpaired Student's *t*-test).

Impaired action of GW9508 in *GPR120*-null mice. To directly assess the role of GPR120 for the effects of GW9508, we analysed *GPR120*-null mice. Under basal conditions, *GPR120*-null mice did not show any significant change in body weight or in the main metabolic parameters evaluated (for example, glycaemia or triglyceridemia; Supplementary Table 2). This agrees with previous reports^{13,14}. To examine the contribution of GPR120 to the actions of GW9508, we treated wild-type and *GPR120*-null mice with the drug for 7 days. The treatment with the drug did not alter glycaemia, triglyceridemia and insulinaemia in *GPR120*-null mice (Supplementary Table 2). GW9508-treated wild-type mice showed increased oxygen consumption both under basal conditions and following the injection with the β 3-adrenergic agonist CL316,243 (Fig. 3a), consistent with the enhanced iWAT browning and signs of BAT activation shown previously. In contrast, *GPR120*-null mice showed a reduction in basal and CL316,243-triggered oxygen consumption. GW9508 treatment increased oxygen consumption in *GPR120*-null mice, but the attained levels were lower in *GPR120*-null versus wild-type mice. Moreover, the capacity of CL316,243 to induce oxygen consumption was strongly impaired in GW9508-treated *GPR120*-null mice (Fig. 3a). *GPR120*-null mice treated with GW9508 exhibited iBAT with larger lipid droplets, which is reminiscent of decreased thermogenic activity (Supplementary Fig. 4). Expression levels of thermogenesis-related transcripts was significantly altered in *GPR120*-null mice for *PGC-1 α* and, especially, for *Bmp8b*, with decreased GW9508-triggered upregulations in *GPR120*-null versus wild-type mice. Total levels of UCP1 protein were unaltered in *GPR120*-null mice (Supplementary Fig. 4).

Browning, identified by the presence of numerous multilocular adipocytes and the induction of several brown-versus-white-related genes (for example, *PGC-1 α* , *UCP1* and *Sirt3*) was

enhanced in the iWAT of GW9508-treated wild-type mice, but this induction was markedly impaired in *GPR120*-null mice (Fig. 3b,d). UCP1 protein levels in iWAT were strongly increased in wild-type mice in response to GW9508 treatment, whereas GW9508-treated *GPR120*-null showed significantly lower levels of UCP1 protein (Fig. 3c).

GPR120 invalidation had especially marked effects on circulating FGF21 levels and *FGF21* expression in the iBAT and iWAT of GW9508-treated mice. The increase of plasma FGF21 observed in GW9508-treated wild-type mice was abrogated in *GPR120*-null mice, as was the significant induction of FGF21 transcript levels elicited by GW9508 in BAT and iWAT (Fig. 3e). There was no alteration of *FGF21* gene expression in the liver, regardless of the treatment or mouse genotype.

These data indicate that GPR120 is largely required for the effects of GW9508 in BAT and iWAT 'in vivo', although the additional involvement of GPR40 cannot be ruled out in light of the dual agonist properties of GW9508.

Impaired thermogenesis and browning in *GPR120*-null mice.

We next tested the effects of cold exposure on *GPR120*-null mice. Most *GPR120*-null mice tolerated exposure to cold (4 °C), but ~20% developed hypothermia (a 10 °C or more drop in body temperature) within the first 24 h of cold exposure; none of the wild-type mice developed similar hypothermia. The estimated core temperature was significantly lower in *GPR120*-null mice than in wild-type mice after 1 day of cold exposure and tended to remain lower after 7 days of cold exposure (Fig. 4a). The microscopic morphology of iBAT did not show major alterations in cold-exposed *GPR120*-null mice and thermogenic gene expression pattern was essentially unaltered in *GPR120*-null mice relative to wild-type controls after 7 days of cold (Supplementary Fig. 5). However, *leptin* expression was increased in *GPR120*-null mice, which is consistent with some extent of 'whitening' in

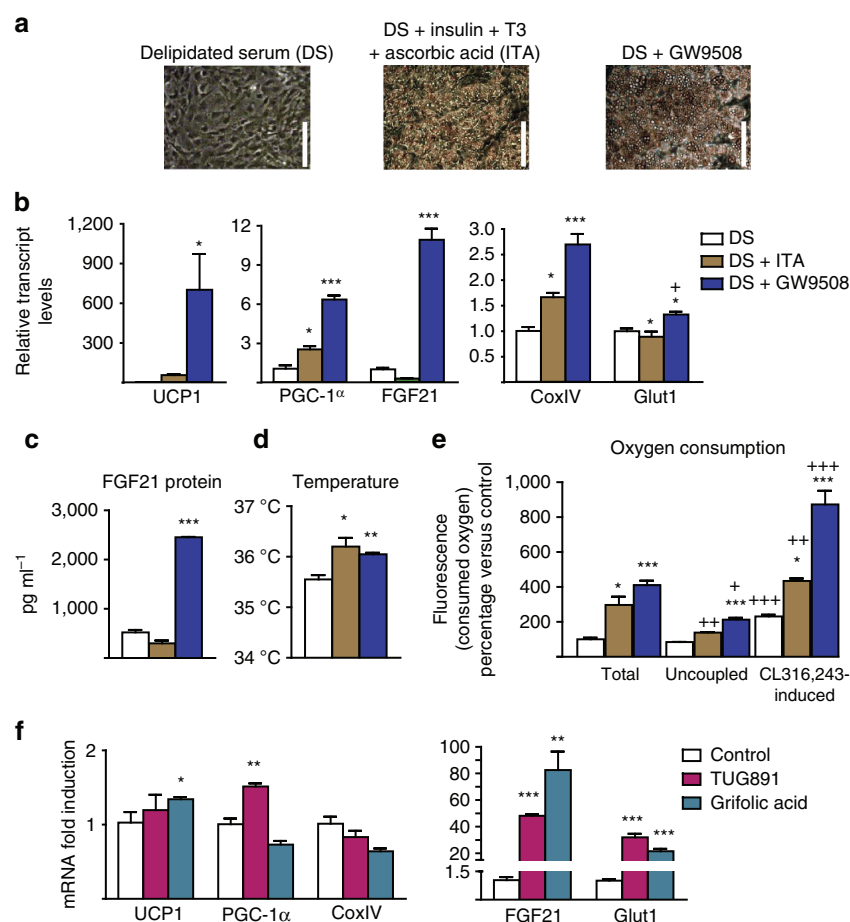


Figure 5 | GPR120 activation induces brown adipocyte differentiation and increases FGF21 expression and release. For **a–e**, iBAT precursors were differentiated in the presence of standard culture medium supplemented as follows: with 10% delipidated serum (DS, white bars; $n = 4$); with DS plus insulin, triiodothyronine and ascorbic acid (DS + ITA, brown bars; $n = 5$); or with DS plus 100 μ M GW9508 (blue bars; $n = 4$). **(a)** Representative optical microscopy images from cells at the end of the differentiation (day 9) (scale bars, 200 μ m). **(b)** Relative mRNA expression levels of *UCP1*, *PGC-1 α* , *COXIV*, *FGF21* and *Glut1*. **(c)** FGF21 protein levels in cell culture media (4 day accumulation). **(d)** Cell culture temperature. **(e)** Total and uncoupled (oligomycin-resistant) respiration, and respiration after CL316,243 treatment **(f)** iBAT precursors from mice were differentiated with DS + ITA, mRNA expression levels of *UCP1*, *PGC-1 α* , *CoxIV*, *FGF21* and *Glut1* after 24 h treatment with TUG-891 (200 μ M, pink bars) or grifolic acid (100 μ M, turquoise bars). Bars are means \pm s.e.m. (P values: $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$ versus DS (**b–e**) or versus controls (**f**); $^+P < 0.05$, $^{++}P < 0.01$ and $^{+++}P < 0.001$ for uncoupled respiration or induction in respiration upon CL316,243 versus total respiration; analysis of variance with Tukey's *post hoc* test).

BAT (Supplementary Fig. 5). iWAT browning was significantly impaired in cold-exposed *GPR120*-null mice. There were far fewer clusters of multilocular adipocytes in the iWAT of *GPR120*-null mice compared with wild-type controls (Fig. 4b), whereas the relative lipid content was higher. The expression levels of the thermogenic genes *UCP1* and *Bmp8b* were reduced, and *FGF21* gene expression tended to be lower (Fig. 4c). Circulating FGF21 levels were significantly reduced in cold-exposed *GPR120*-null mice (Fig. 4d), whereas FGF21 transcript expression in the liver and skeletal muscle was unaltered (Supplementary Fig. 5).

GPR120 activation induces brown adipocyte thermogenesis.

We next used cell culture systems of brown and beige adipocytes to assess whether the abilities of GPR120 activation to promote BAT activation, WAT browning and FGF21 induction were cell autonomous. GW9508 was used to determine the specific effects of GPR120 activation as brown adipocytes (similar to white adipocytes) lack detectable levels of *GPR40* transcript and thus the actions of GW9508 are only attributable to GPR120 activation^{13,24}.

First, we determined whether GPR120 activation targets brown adipocyte differentiation. Precursor cells were obtained from

iBAT stromal vascular fractions and cultured as previously reported²⁵. On day 4 of culture, regular medium was replaced to contain 10% delipidated serum, which does not allow differentiation (Fig. 5a)²⁶. The addition of insulin, triiodothyronine and ascorbic acid (ITA) to the culture was sufficient to induce differentiation. Notably, the addition of GW9508 instead of ITA also yielded a robust differentiation of brown adipocytes (Fig. 5a). Analysis of brown differentiation marker genes (for example, *UCP1*, *PGC-1 α* , *COXIV* and *Glut1*) indicated that GW9508 triggered a stronger induction compared with ITA (Fig. 5b). Among the tested genes, the highest GW9508-induced upregulation was seen for FGF21 (Fig. 5b). These effects on *FGF21* gene expression were associated with a strong release of FGF21 to the media of GW9508-treated cultures (Fig. 5c). Highly sensitive thermography^{27,28} showed that GW9508 treatment increased the cell cultures temperature (Fig. 5d). Moreover, oxygen consumption in brown adipocytes differentiated in the presence of GW9508 was as high as in ITA-differentiated cells (Fig. 5e). GW9508-induced differentiation also enhanced the oxygen consumption triggered by the β_3 -adrenergic agonist CL316,243 (Fig. 5e).

We next analysed the effects of GPR120 activation on mature, differentiated, brown adipocytes (day 9 of culture). Treatment

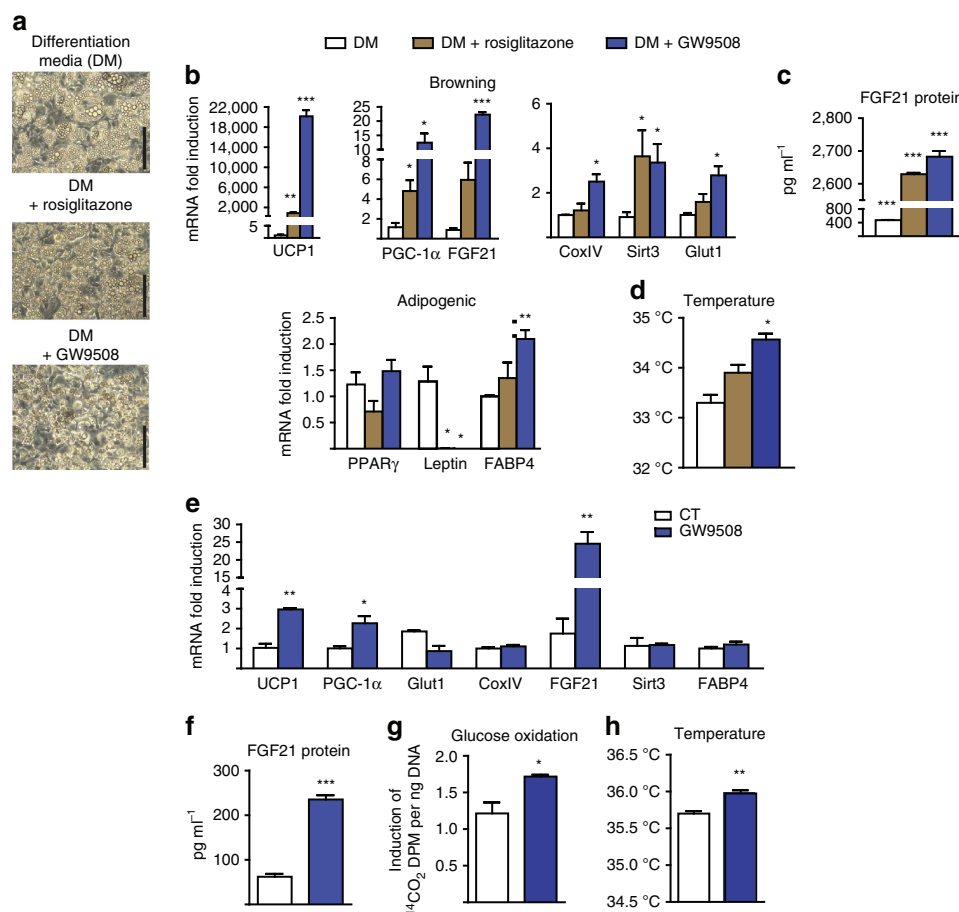


Figure 6 | GPR120 activation promotes beige adipocyte differentiation and increases FGF21 expression and release. For **a-d**, iWAT precursors from mice were differentiated in the presence of the differentiation media (DM, white bars), supplemented with rosiglitazone to drive beige differentiation (DM + rosiglitazone, brown bars; $n = 4$) or treated with GW9508 instead of rosiglitazone (DM + GW9508, blue bars; $n = 5$; see the Methods section). **(a)** Representative optical microscopy images at the end of differentiation (day 7; scale bar, 200 μm). **(b)** Relative mRNA expression levels of browning-related and general adipogenic genes. **(c)** FGF21 protein levels in the cell culture medium (4 day accumulation). **(d)** Cell culture temperature. For **e-h**, iWAT precursors were differentiated and treated during 24 h with GW9508 (100 μM , blue bars; $n = 5$) or not treated ($n = 3$). **(e)** mRNA expression levels of *UCP1*, *PGC-1 α* , *Glut1*, *COXIV*, *FGF21*, *Sirt3* and *FABP4*. **(f)** FGF21 protein levels in culture media (24 h accumulation). **(g)** Glucose oxidation rate. **(h)** Cell culture temperature. Bars are means \pm s.e.m. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus DM (**b-d**) or versus controls (**e-h**); for **b-d**, analysis of variance with Tukey's *post hoc* test was performed; for **e-h**, two-tailed unpaired Student's *t*-test).

with GW9508 for 24 h led to a marked induction of *UCP1*, *Glut1* and *FGF21* expression, as well as a strong increase in the secretion of FGF21 protein (Supplementary Fig. 6). Moreover, GW9508 significantly induced the glucose oxidation and tended to increase the cell culture temperature (Supplementary Fig. 6).

To examine whether drugs that also activate GPR120 specifically cause similar effects, we tested TUG-891²⁹ and grifolic acid³⁰. Indeed 0.2 mM TUG-891 and 0.1 mM grifolic acid strongly upregulated *FGF21* and *Glut1*, and had milder effects on *UCP1* and *PGC-1 α* (Fig. 5f).

Collectively, these results indicate that GPR120 activation has cell-autonomous effects on brown adipocytes, including a strong effect in promoting brown adipocyte differentiation and a particularly strong activation of FGF21 expression and release associated with signs of the enhanced oxygen consumption, glucose oxidation and thermogenesis.

GPR120 activation induces beige adipocyte thermogenesis. To analyse the cell-autonomous effects of GPR120 activation on the WAT browning process, primary cultures of precursor cells

obtained from iWAT were cultured in regular differentiation medium and exposed to rosiglitazone to promote acquisition of the beige phenotype³¹. Rosiglitazone treatment did not alter the morphology of differentiating cells or the lipid droplet accumulation, but did tend to decrease the lipid droplet size (Fig. 6a). Rosiglitazone did not alter the expression of general adipogenic marker genes in differentiating adipocytes; instead it downregulated leptin (a marker of the WAT versus BAT phenotype) and strongly upregulated the beige markers *UCP1* and *PGC-1 α* (Fig. 6b). Supplementation with GW9508 instead of rosiglitazone caused a similar, even stronger, induction of browning, as evidenced by upregulation of the beige marker genes (*UCP1*, *PGC-1 α* and *Sirt3*; Fig. 6b) and downregulation of leptin, while leaving most general adipogenic genes unaltered. Rosiglitazone-induced and especially GW9508-induced beige differentiation strongly upregulated the expression (Fig. 6b) and release of FGF21 (Fig. 6c). Consistent with the gene expression data, the heat production was significantly higher in GW9508-treated beige cells (Fig. 6d).

We next questioned whether the effects of the GPR120 activation also occurred in adipocytes that had differentiated to a beige phenotype. Indeed, GW9508 treatment of differentiated

beige adipocytes for 24 h triggered a moderate but significant upregulation of thermogenic marker genes (*UCP1* and *PGC-1 α*), and a stronger induction of *FGF21* expression (Fig. 6e) and release (Fig. 6f). GW9508 also increased the glucose oxidation rate (Fig. 6g) and cellular heat production (Fig. 6h) in beige adipocytes.

Compared with iWAT precursors, eWAT precursors yielded similar results with GW9508 inducing even stronger browning than rosiglitazone (as shown by gene expression analysis) and powerfully inducing *FGF21* expression and release in differentiated adipocytes (Supplementary Fig. 7).

n-3 PUFAs promote brown fat activation through GPR120.

GPR120 is assumed to interact with unsaturated fatty acids—or derivatives—at the cell surface and trigger subsequent intracellular effects¹². Since omega-3 PUFAs are more potent than omega-6 or omega-9 PUFAs in eliciting GPR120-mediated effects^{12,13}, we analysed the effects of α -linolenic (ALA), eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids.

Supplementation of delipidated cell culture medium with EPA or ALA markedly promoted the morphological adipogenic differentiation of brown pre-adipocytes obtained from iBAT, to a degree similar to that elicited by ITA (Fig. 7a). In contrast, DHA had barely significant effects. The thermogenic genes, especially *UCP1* and *FGF21*, were markedly induced by EPA and ALA, relative to ITA. Some induction of general adipogenic genes was also observed, especially in response to EPA (Fig. 7b). EPA and ALA also enhanced *FGF21* protein secretion relative to ITA (Fig. 7c). The cellular temperature was increased by EPA relative to cells cultured in delipidated medium, but there was no significant temperature difference relative to ITA-differentiated cells (Fig. 7d). EPA treatment increased oxygen consumption to an extent similar to that elicited by ITA, under both basal and CL316,243-treated conditions (Fig. 7e).

EPA and ALA treatment of beige adipocytes undergoing differentiation from iWAT precursors promoted their morphological differentiation (Fig. 7f), significantly upregulated the tested thermogenic-related genes (with the exception of a non-significant effect of ALA on *UCP1* and *PGC-1 α*), and downregulated leptin (Fig. 7g). EPA and ALA increased *FGF21* gene expression and release (Fig. 7h), but only EPA significantly increased cell temperature. Overall, in both, the brown and beige experimental settings, EPA tended to be more powerful than ALA.

As PPAR α is known to mediate transcriptional effects of fatty acids in brown adipocytes²⁵ and regulates *FGF21* expression in the liver^{32,33}, we determined the effects of EPA on primary cultures of precursor cells from the iBAT of PPAR α -null mice. As expected, the absence of PPAR α did not alter the responsiveness of brown adipocytes to GW9508 (Supplementary Fig. 8a). EPA still promoted brown adipocyte differentiation and strongly induced *FGF21* in cells devoid of PPAR α , although the levels of *FGF21* expression attained were smaller (Supplementary Fig. 8a). We also determined whether the effects of EPA could involve PPAR γ . Exposure of differentiating brown adipocytes to the PPAR γ inhibitor, GW9662, did not significantly alter the effects of EPA or GW9508 on the morphological differentiation; the significant upregulation of the *FGF21* gene in response to EPA was maintained, but the levels achieved were significantly less than those observed in the absence of the PPAR γ inhibitor (Supplementary Fig. 8b). These results indicate that although PPARs are not necessary for the ability of EPA to induce *FGF21*, they may contribute to some of the effects of EPA.

We further determined the involvement of GPR120 in mediating the effects of EPA on the brown and beige differentiation of pre-adipocytes. For this purpose, we analysed precursor cells cultures from the iBAT and iWAT of *GPR120*-null

mice and wild-type controls. Precursor cells from *GPR120*-null iBAT showed much less differentiation into brown adipocytes, as evidenced by decreased acquisition of brown adipocyte morphology (Fig. 8a), impaired expression of thermogenic marker genes (*UCP1* and *FGF21*; Fig. 8b), and signs of reduced expression of general adipogenesis marker genes. EPA treatment significantly induced *FGF21* mRNA expression (Fig. 8c) and *FGF21* protein secretion (Fig. 8d) in wild-type brown adipocytes, but not in *GPR120*-null cells that were totally insensitive to EPA. Precursor cells from *GPR120*-null iWAT showed a delayed differentiation (Fig. 8e; see microscopic morphology on day 3 of culture), but ultimately reached similar levels of thermogenic and adipogenic gene expression by day 7. The abilities of EPA to induce *FGF21* mRNA expression and *FGF21* protein release were significantly reduced in *GPR120*-null beige adipocytes (Fig. 8f).

Next, we used two independent approaches to determine whether EPA affects *FGF21* expression and release by previously differentiated brown or beige adipocytes, and whether GPR120 mediated these effects. First, we treated differentiated cells with the GPR120 antagonist, AH7614 (ref. 34). As expected, AH7614 significantly inhibited the capacity of GW9508 to induce *FGF21* expression and release in brown and beige adipocytes (Fig. 8g). AH7614 also inhibited the effects of EPA on *FGF21* expression and release, indicating that these effects involve GPR120 in brown and beige adipocytes.

Second, we performed short interfering RNA (siRNA)-driven knockdown of GPR120 in brown adipocytes subjected to *in vitro* differentiation. In these cells, we obtained an 80% reduction in the mRNA expression of the GPR120 as compared with controls (Fig. 8h, left). Under these conditions of GPR120 knocking down, the abilities of GW9508 and EPA to induce *FGF21* gene expression were also strongly impaired (Fig. 8h). GPR120 knocking down also impaired the induction of *UCP1* and *PGC-1 α* by EPA.

Collectively, these findings indicate that EPA induces brown and beige differentiation, and enhances *FGF21* gene expression and *FGF21* protein secretion mostly via GPR120 activation.

GPR120-mediated induction of FGF21 involves p38 MAPkinase.

To further explore the mechanisms through which GPR120 activation induces *FGF21* gene expression, differentiated brown adipocytes were treated with GW9508 in the presence or not of intracellular kinase inhibitors. U-0128 and wortmannin significantly reduced the upregulation of *FGF21* gene expression in response to GW9508 or EPA (Supplementary Fig. 9a), confirming the previously reported involvement of ERK1/2 and PI3kinase, respectively, in the intracellular actions following GPR120 activation in other cell systems, such as white adipocytes¹³. In contrast, the inhibitors of PKA or AMP kinase had no effect (Supplementary Fig. 9a). Interestingly, the p38 MAPK inhibitor, SB202190, strongly impaired GW9508- or EPA-induced *FGF21* gene expression. Treatment of brown adipocytes with GW9508 or EPA induced the phosphorylations of p38 MAPK and (as expected) ERK1/2, but not of other regulatory proteins such as CREB (Supplementary Fig. 9b). As p38 MAPK mediates the regulation of *FGF21* in response to noradrenergic stimuli in BAT¹⁹, we determined the effects of GW9508 and EPA on the transcriptional regulation of the *FGF21* gene promoter. We found that these agents significantly induced the activity of the *FGF21* promoter (Supplementary Fig. 9c). Conversely, a version of the promoter devoid of the p38 MAPK-responsive site failed to respond to GW9508 or EPA. Moreover, transfection of an expression vector for MKK6 (MKK6-K82A), which acts as dominant negative for p38 MAPK-dependent activation³⁵, blunted the effects of GW9508 and EPA on the *FGF21* gene promoter activity. These findings suggest that GPR120-induced

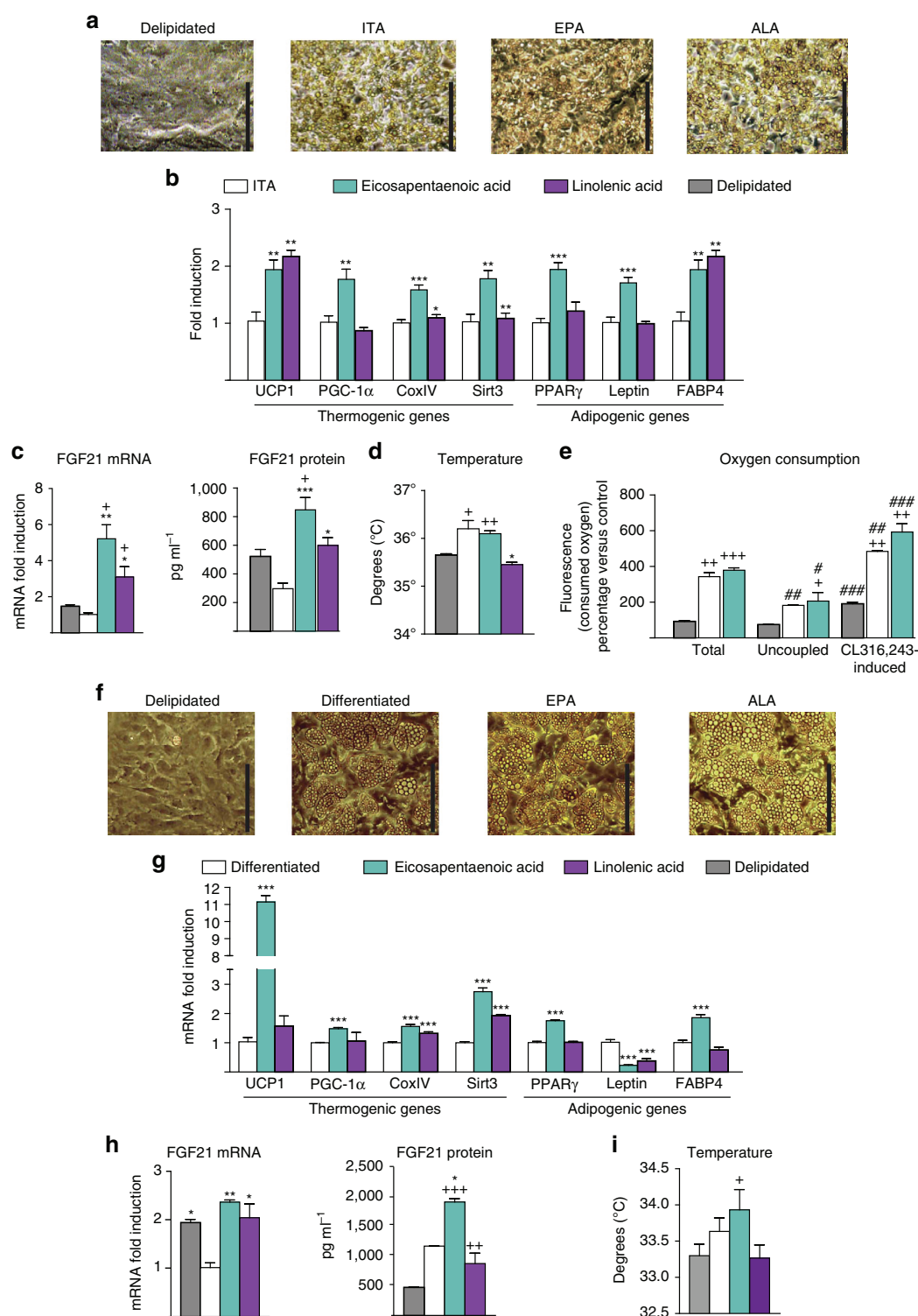


Figure 7 | n-3 PUFAs upregulate thermogenic genes expression and FGF21 expression and release. For **a-d**, iBAT precursors were cultured in media containing only delipidated serum (grey bars), or in the presence of insulin, T3 and ascorbic acid (ITA, white bars) or supplemented with eicosapentaenoic acid (EPA, turquoise bars) or linolenic acid (ALA, purple bars). **(a)** Representative optical microscopy images of cultured brown precursors after the treatment (scale bar, 200 μ m). **(b)** Relative mRNA expression of thermogenesis-related and general adipogenesis-related genes. **(c)** FGF21 mRNA in adipocytes and protein levels in culture media. **(d)** Cell culture temperature. **(e)** Total and uncoupled respiration after differentiation and after treatment with CL316,243. For **f-i**, iWAT precursors were cultured in media containing only delipidated serum (grey bars), adipogenic cocktail (see the Methods section, white bars), or supplemented with EPA (turquoise bars) or ALA (purple bars). **(f)** Representative optical microscopy images of cultured beige precursors after the treatment (scale bar, 200 μ m). **(g)** Relative mRNA expression of thermogenesis-related and general adipogenesis-related genes. **(h)** FGF21 mRNA in adipocytes, protein levels in culture media and **(i)** cell temperature at the end of the treatment. Bars are means \pm s.e.m. (* P < 0.05, ** P < 0.01 and *** P < 0.001 versus differentiated ITA, + P < 0.05, + + P < 0.01 and + + + P < 0.001 versus delipidated, # P < 0.05, ## P < 0.01 and ### P < 0.001 relative to total respiration; analysis of variance with Tukey's *post hoc* test).

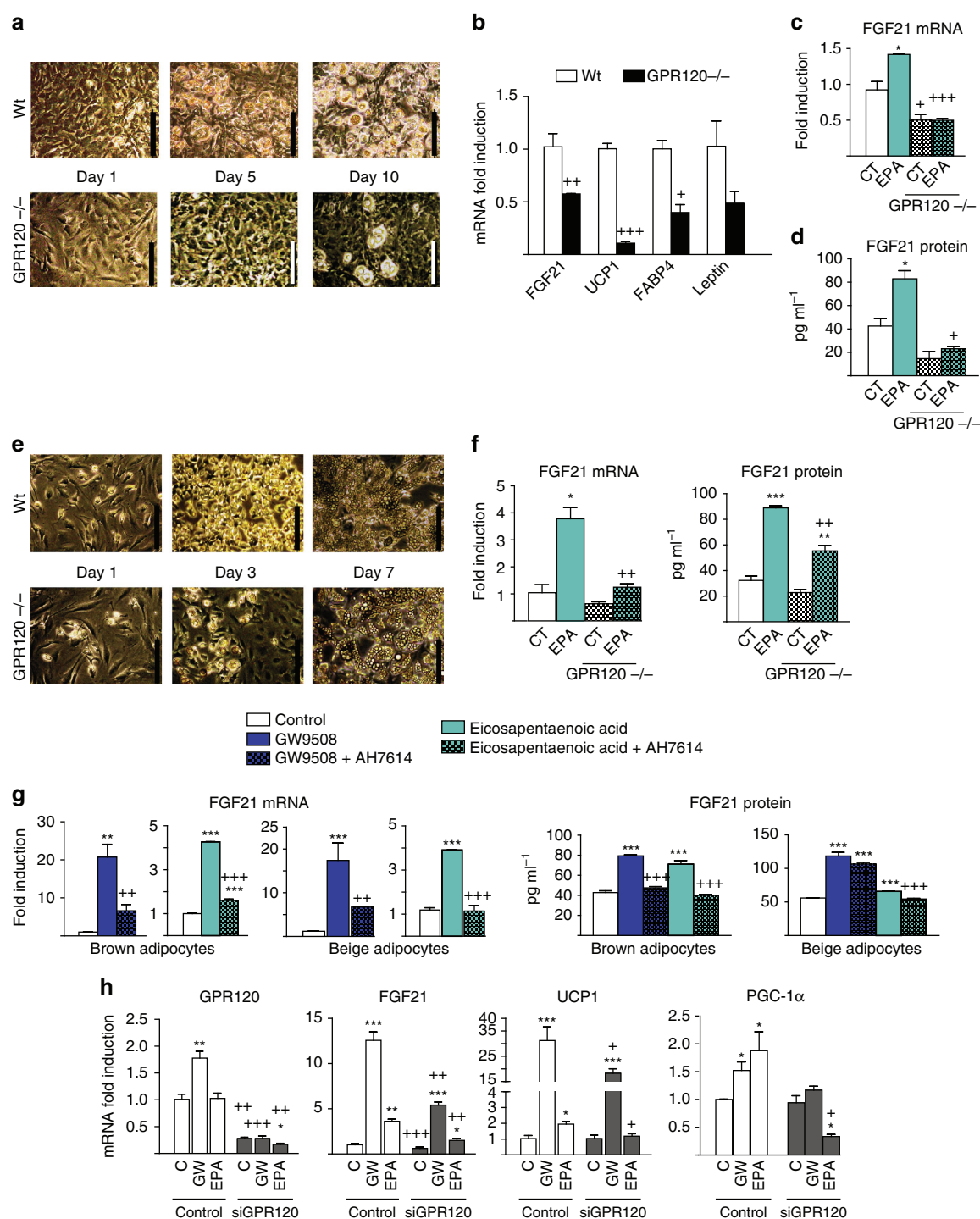


Figure 8 | GPR120 is required for the effects of EPA on adipocytes and FGF21 induction and release. For **a–d**, iBAT precursors from wild-type (n = 3, white) and *GPR120*-null (n = 5, black) mice were differentiated. **(a)** Representative optical microscopy images (scale bar, 200 μm). **(b)** Relative mRNA expression levels of *FGF21*, *UCP1*, *FABP4* and *leptin*. **(c,d)** Effects of EPA on *FGF21* mRNA expression and *FGF21* secretion. For **e** and **f**, iWAT precursors from wild-type (n = 3) and *GPR120*-null (n = 5) mice were differentiated into beige adipocytes. **(e)** Representative optical microscopy images (scale bar, 200 μm). **(f)** Effects of EPA on *FGF21* mRNA expression and *FGF21* protein secretion. **(g)** Differentiated brown and beige adipocytes were treated with GW9508 (blue bars) or EPA (turquoise bars) in the presence or absence of AH7614 (a *GPR120* antagonist, patterned bars) for 24 h (n = 3). *FGF21* mRNA expression and *FGF21* protein levels in culture medium. **(h)** Differentiated brown adipocytes were subjected to siRNA-mediated knockdown of *GPR120* (see the Methods section) and treated with GW9508 or EPA. mRNA expression levels of *GPR120*, *FGF21*, *PGC-1α* and *UCP1* (n = 3). Bars are means ± s.e.m. (*P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001 relative to controls, and +P < 0.05, ++P < 0.01 and +++P < 0.001 for comparisons between wild-type and *GPR120*-null cells (**a–f**), the effects due to AH7614 (**g**), and the effects due to siRNA-*GPR120* (**h**). For **b**, two-tailed unpaired Student's *t*-test was performed; for **c–h**, analysis of variance with Tukey's *post hoc* test).

FGF21 expression in brown adipocytes involves the activation of p38 MAPK and its downstream induction of FGF21 gene transcription.

FGF21 is involved in the effects of GPR120 activation. FGF21, which is a hormonal factor expressed and released by brown and beige cells^{19,20}, has strong autocrine/endocrine effects on BAT activation and WAT browning^{36,37}. Thus, we next explored the involvement of FGF21 in the biological response to GPR120 activation.

FGF21-null mice were treated with GW9508 in their diet for 1 week. The absence of FGF21 strongly impaired the capacity of GW9508 to induce BAT thermogenic activation, as evidenced by decreased induction of thermogenic genes (for example, *UCP1*, *PGC-1 α* and *Bmp8b*) and *Glut1*, whereas markers of general adipogenesis (for example, *FABP4*) were unaltered (Fig. 9a). FGF21-null mice kept under basal conditions exhibited increased lipid content, indicative of impaired activity and ‘whitening’ of BAT (Fig. 9b). GW9508 treatment of FGF21-null mice, in contrast with wild-type mice, even increased the signs of impaired thermogenic activity and ‘whitening’ of BAT as evidenced by increased lipid content and enhanced leptin gene expression. Moreover, GW9508 failed to increase UCP1 protein levels in BAT from FGF21-null mice (Fig. 9b).

FGF21-null mice also showed strong impairment of iWAT browning in response to GW9508. The clusters of multilocular, beige adipocytes, seen in GW9508-treated wild-type mice were largely absent in GW9508-treated FGF21-null mice (Fig. 9d), and there were strong reductions in the GW9508-mediated upregulation of the thermogenic, beige phenotype-related, genes (for example, *PGC-1 α* , *UCP1* and *Sirt3*; Fig. 9c). GW9508 treatment increased UCP1 protein levels in iWAT from wild-type mice and the extent of induction of UCP1 protein levels in FGF21-null mice was significantly lower. Although the response of eWAT to GW9508-induced browning was less marked than that in iWAT of wild-type mice, the mild upregulation observed among browning-associated genes was blunted in GW9508-treated FGF21-null mice (Supplementary Fig 10).

We further explored the cell-autonomous functions of FGF21 in the responsiveness to GPR120 activation. Brown adipocytes from FGF21-null mice differentiated normally *in vitro*, and GPR120 expression was not altered by the lack of FGF21. GW9508 was able to activate the expressions of thermogenic genes (*UCP1*, *PGC-1 α* , *COXIV* and *Sirt3*) in cultured brown adipocytes, but the extent of these inductions were significantly less in FGF21-null cells than in control cells (Fig. 10a). When previously differentiated brown adipocytes from FGF21-null mice were treated with GW9508 for 24 h, we observed reductions in the upregulations of some thermogenic genes (Fig. 10b) and glucose oxidation (Fig. 10d). In beige adipocytes differentiated from iWAT, the lack of FGF21 reduced the GW9508-induced upregulations of beige markers (*UCP1* and *PGC-1 α* ; Fig. 10c) and blocked the ability of GW9508 to induce glucose oxidation (Fig. 10d).

Collectively, these results indicate that at least some of the effects of GPR120 activation on the thermogenic activations of brown and beige adipocytes involve FGF21, potentially via the autocrine/endocrine actions of FGF21 secreted downstream of GPR120 activation.

Discussion

The identification of novel regulators that promote energy expenditure and the capacity of BAT activity to oxidize metabolic substrates may provide key therapeutic targets in obesity, diabetes and dyslipidemias. Attempts to promote energy expenditure by the use of sympathomimetics, which take advantage of the

classical adrenergic pathway for controlling of BAT activity, have failed due to the important side effects³⁸.

We presently identified a novel pathway regulated by the fatty acid receptor GPR120 that controls BAT activity and WAT browning. Our data indicate that GPR120 activation plays a dual role, namely: (1) it promotes the differentiation of pre-adipocytes into the brown and beige lineages; and (2) it promotes thermogenic activation in differentiated brown and beige adipocytes. Previous reports showed that GPR120 activation increases the energy expenditure and ameliorates insulin resistance^{13,14}. Given that BAT activity and WAT browning have major impacts on energy expenditure and glucose homeostasis, our current data provide a biological basis and mechanistic explanation for these observations. This adds a new function for GPR120, in addition to its ability to decrease chronic inflammation, in association with the improved insulin resistance^{13,39}. Modifications in the pro- and anti-inflammatory profiles of immune cells were recently reported to influence BAT activation and especially WAT browning^{40,41}. Further research is warranted to determine the role of GPR120-mediated regulation of immune cells on BAT and browning of WAT *in vivo*; however, our current findings establish a direct, cell-autonomous effect, of GPR120 in the promotion of brown and beige cell differentiation and activation.

The effects of GPR120 activation on BAT activity and WAT browning appear to mediate the actions of omega-3 PUFAs, which are physiological activators of the GPR120 receptor, on these processes. Dietary enrichment with omega-3 PUFAs have beneficial effects on metabolic health in healthy lean individuals, whereas in experimental rodent models, omega-3 PUFA have been shown to prevent the development of obesity, and decrease hyperglycaemia and dyslipidemia⁴². Several reports agreed that dietary supplementation with PUFAs promote BAT recruitment and WAT browning as reflected by enhanced mitochondrial oxidative capacity and, in some reports, increased UCP1 content^{43–47}. Single dietary supplementation with EPA (but not DHA) has reportedly had the most significant effects⁴³, and recent data show an especially active effect of EPA in the promotion of browning *in vitro*⁴⁸. The molecular mechanisms underlying these effects remained to be clarified. Our current data indicate that omega-3 PUFAs have cell-autonomous GPR120-mediated effects directly stimulating the differentiation and activation of brown and beige adipocytes. This strongly supports the notion that GPR120 activation is involved in the actions of dietary omega-3 PUFAs on BAT activation, WAT browning and metabolic consequences, and may provide a molecular explanation for some of the beneficial effects of PUFAs.

Our study also shows that some of the effects triggered by GPR120 activation are mediated via the GPR120-induced expression and release of FGF21 in brown and beige adipose tissues. Fatty acids stimulate the expression of FGF21 in hepatic cells, which are devoid of GPR120, in a PPAR α -mediated manner³². However, this pathway does not mediate FGF21 gene expression in BAT¹⁹. Our present data indicate that GPR120 activation is part of a highly tissue-specific pathway that regulates FGF21 expression via the p38 MAPK-mediated activation of FGF21 gene transcription in brown and beige cell lineages. Moreover, the effects of GPR120 activation to promote BAT activity and WAT browning are mediated at least in part by FGF21. FGF21 promotes thermogenic activation of BAT, and the browning of WAT in association with increased glucose uptake and oxidation^{36,37}. Similar effects were seen following GPR120 activation, and these effects were reduced in FGF21-inactivated animal and cell models. Thus, we herein report that autocrine and (perhaps) endocrine actions of FGF21 are relevant to the GPR120 activation-mediated induction of BAT differentiation and WAT

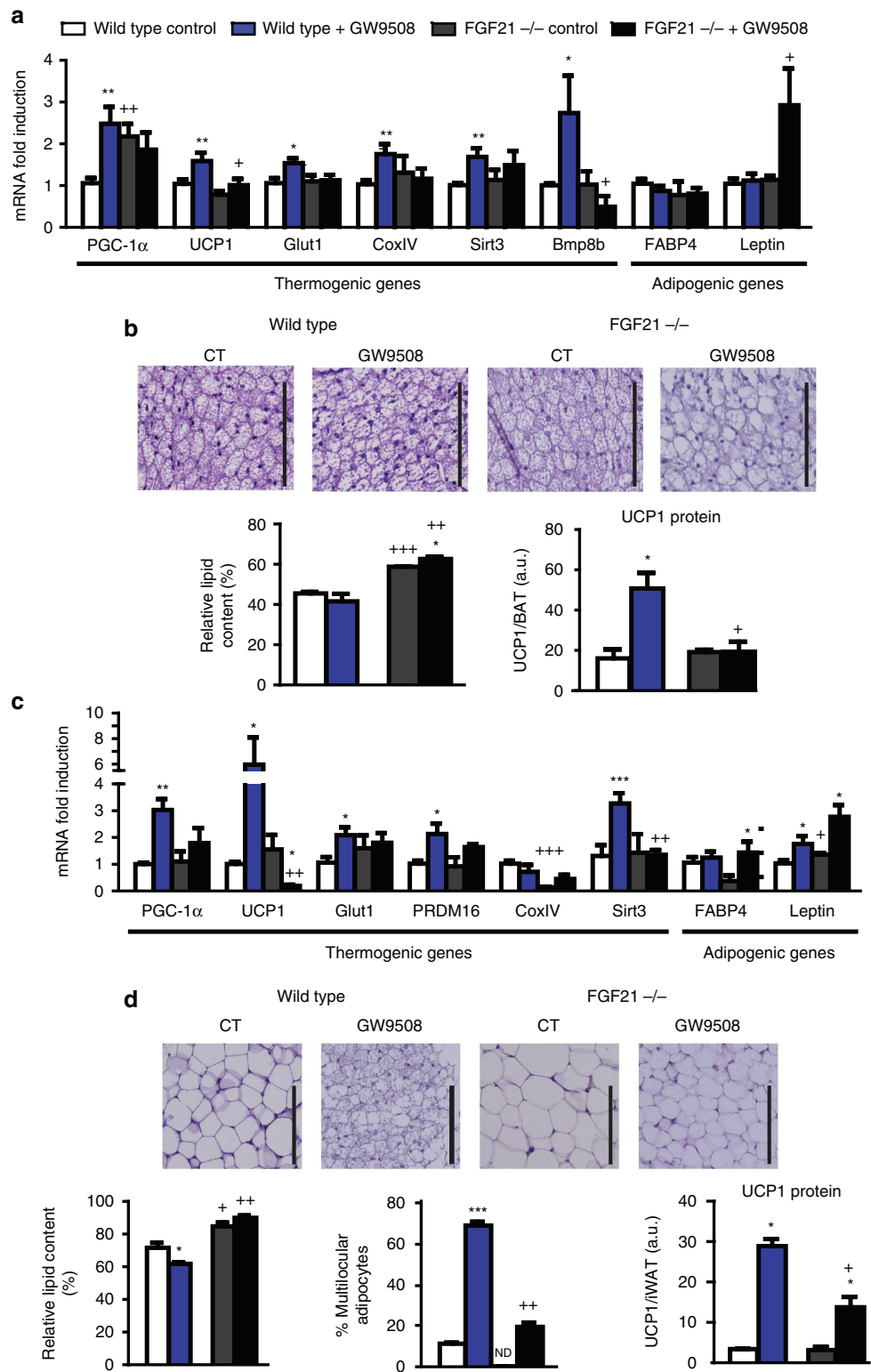


Figure 9 | FGF21 gene invalidation reduces the effects of GW9508 treatment in mice. Wild-type and *FGF21*-null mice were fed a control diet (white and grey bars, respectively) or supplemented with GW9508 (blue and black bars, respectively) for 7 days ($n = 5$). **(a)** Relative mRNA levels of thermogenesis-related and adipogenic genes in iBAT **(c)** and iWAT. Representative optical microscopy images of H&E staining (scale bar, 125 μ m), the relative lipid content and UCP1 protein levels in iBAT **(b)** and iWAT **(d)**, and the percentage of multilocular adipocytes in iWAT. Bars are means \pm s.e.m. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ relative to untreated control mice of each genotype; + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ and +++ $P < 0.001$ relative to same treatment of the wild-type group; analysis of variance with Tukey's *post hoc* test).

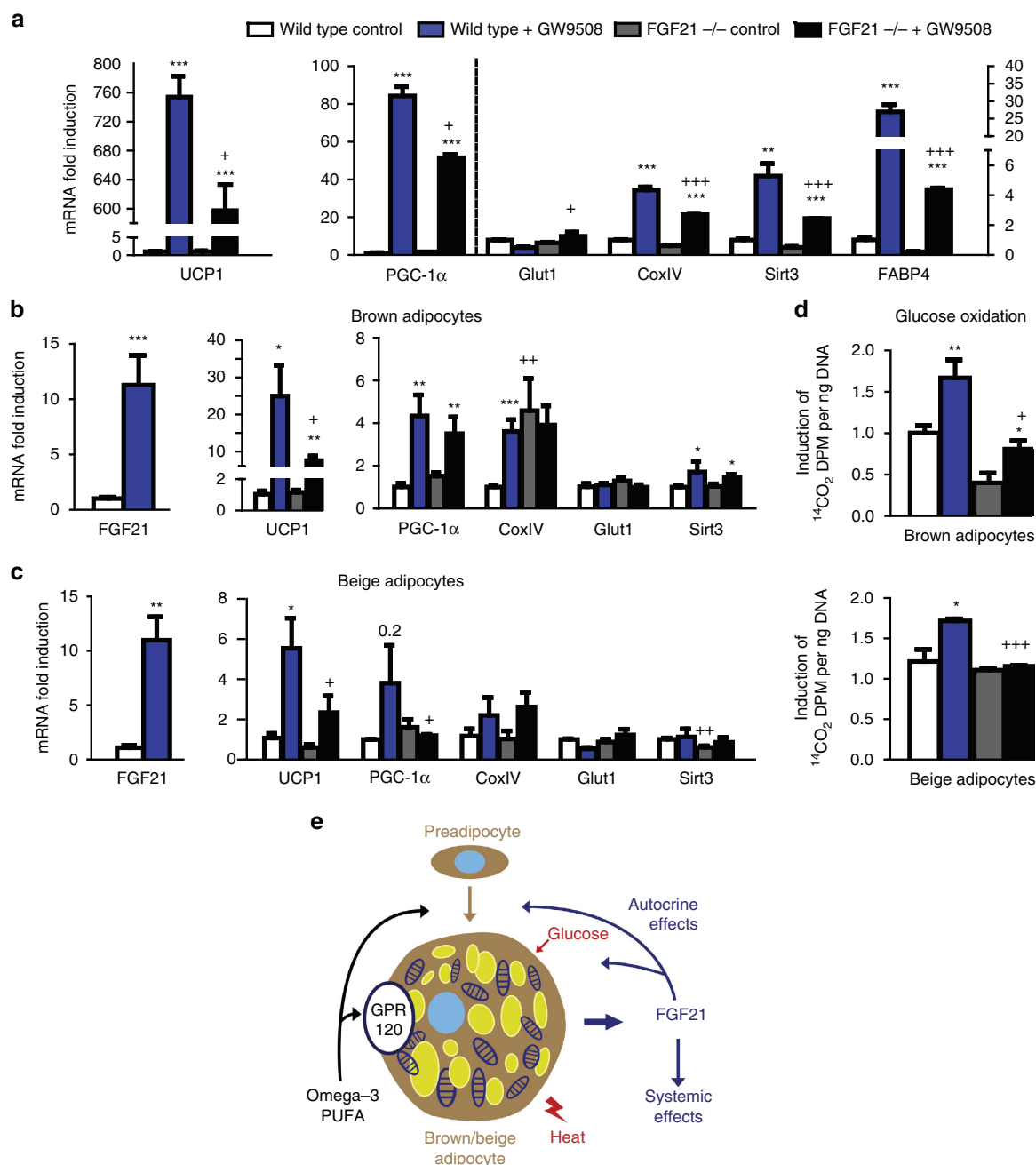


Figure 10 | Impaired effects of GW9508 on FGF21-null brown and beige adipocytes. (a) iBAT precursors from wild-type and FGF21-null mice ($n = 5$) were treated with GW9508 during differentiation, relative transcript levels of *UCP1*, *PGC-1 α* , *Glut1*, *CoxIV*, *Sirt3* and *FABP4*. (b) iBAT precursors from wild-type and FGF21-null mice ($n = 5$) were differentiated and acutely treated with GW9508 (24 h), mRNA expression levels of *FGF21*, *UCP1*, *PGC-1 α* , *CoxIV*, *Glut1* and *Sirt3*. (c) iWAT precursors from wild-type and FGF21-null mice ($n = 5$) were differentiated and acutely treated with GW9508 (24 h), mRNA expression levels of *FGF21*, *UCP1*, *PGC-1 α* , *CoxIV*, *Glut1* and *Sirt3*. (d) Glucose oxidation in iBAT and iWAT-derived adipocytes from wild-type and FGF21-null mice after 24 h treatment with GW9508. Bars are means \pm s.e.m. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ for the effects of GW9508; and + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ and +++ $P < 0.001$ for comparisons between wild-type and FGF21-null cells; and analysis of variance with Tukey's *post hoc* test). (e) Schematic representation of the effects of GPR120 activation by n-3 PUFAs on brown and beige adipocytes. FGF21 is involved in the GPR120 activation-mediated thermogenic activation of BAT and WAT via autocrine/endocrine mechanisms.

browning (Fig. 10e). Of note, the capacity of GPR120 activation to modify intracellular kinases (for example, p38 MAPK) suggests that GPR120 may have additional and direct effects on BAT activity and WAT browning.

In conclusion, we identified a novel pathway of BAT activation and browning of WAT based on a strong, cell autonomous, capacity of the lipid sensor GPR120 to trigger these processes. This pathway is expected to contribute to the systemic metabolic

benefits occurring after GPR120 activation. Our present findings reinforce the current interest in the potential of GPR120-activating drugs or dietary molecules for treating metabolic diseases.

Methods

RNA-seq and RNA-seq data analysis. Total RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen), which favours purification of RNA molecules longer than 200

nucleotides. Further sample preparation was done as described by the manufacturer (Illumina, Eindhoven, The Netherlands). Briefly, mRNA was purified from 2 µg total RNA using oligo (dT) beads, and then fragmented and randomly primed for reverse transcription followed by second-strand synthesis to create double-stranded cDNA fragments. The generated cDNA had undergone paired-end repair to convert overhangs into blunt ends. After 3'-monoadenylation and adaptor ligation, the cDNAs were purified by 2% agarose gel electrophoresis and 200-bp products were excised from the gel. Following gel digestion, the purified cDNA was amplified by PCR using primers specific for the ligated adaptors. Before sequencing, the generated libraries were submitted to a quality control assessment with an Agilent bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Wokingham, UK). The RNA integrity number values for all samples were at least 7.5. To verify the cDNA quality and quantity, 1 µl cDNA was loaded on an Agilent DNA chip (DNA-1000, Agilent Technologies). Only libraries that yielded satisfactory results from the quality control studies were sequenced on an Illumina HiSeq 2,000 sequencer (DNAnvision, Charleroi, Belgium) with an average of 45 million reads per sample. This level of coverage was previously shown to provide sufficient sequencing depth for the quantification of gene expression and detection of transcripts⁴⁹ and has been used in our previous studies^{50,51}. The obtained 100 nucleotide paired-end reads were mapped to the mouse genome (version GRCm38) using the Tophat mapper. Using this approach, we were able to map 87% of the raw reads on average. Sequencing reads were mapped to the mouse genome (*Mus musculus* version GRCm38) using Tophat version 2.02 (ref. 52) under default options for paired-end read mapping. Mapped reads were used to quantify transcripts from the Ensembl version 73 gene annotation data set (<http://www.ensembl.org>) using the Flux Capacitor approach. This strategy deconvolutes reads mapping to exonic regions shared by multiple transcripts by optimizing a system of linear equations, and thus specifically assigns some reads to each alternative splice form (<http://flux.sammeth.net>)⁵³. All genes and transcripts were assigned relative coverage rates as measured in RPKM units ('reads per kilobase per million mapped reads')⁵⁴. Lists of differentially expressed genes and transcripts were generated from the Flux Capacitor output using scripts in Perl or R. The 88,346 transcripts annotated in Ensembl 73 corresponded to 33,358 genes. Mice kept under the thermoneutral temperature were found to express a median of 18,494 genes. Of them, 15,971 genes were found in all tested individuals.

To define the genes that were upregulated or downregulated by cold, the fold change was calculated as the proportion between the sum of the RPKM for all gene transcripts under the cold condition and the same sum in control condition. Significance was tested using a Fisher's exact test (the number of reads mapped to a given gene and number of reads mapped to all other genes in the cold condition versus the control condition) and corrected by the Benjamini-Hochberg method (taking for each gene the four samples as independent tests). A difference in gene expression was considered significant if the corrected *P* value was <0.05. As additional criteria, a gene was considered to be 'modified by cold' only if its expression changed significantly in the same direction—that is, 'up' or 'down'—in at least three out of four samples per group and no significant change in the opposite direction was observed, as in previous studies^{50,51}.

Animals and treatments in vivo. For RNA-seq analysis, eight adult (5 months old at the moment of the experiment) male C57BL6 mice were obtained from Harlan Laboratories and were maintained at thermoneutral temperature (29 °C). After 2 weeks, four mice randomly were placed at an environment temperature of 4 °C for 24 h. Cold-exposed mice and thermoneutral controls were killed by decapitation, iBAT was dissected and frozen for further analysis. *Fgf21*^{-/-} mice (B6N.129S5-Fgf21^{tm1Lex/Mmcd}) were obtained from the Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC), an NCR-NIH-funded strain repository, having been donated to the MMRRC by Genentech, Inc. *Pparα*-null mice (B6.129S4-*Pparα*^{tm1Gonz/J}) were obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). *GPR120* -/- mice (Ffar4^{tm1(KOMP)Vlcg}) were purchased from MMRRC. Adult (5 months old) male wild-type littermates were used as controls for all experiments with *Fgf21*-null mice, *Pparα*-null mice and *GPR120*-null mice. When indicated, mice were injected intraperitoneal with 1 mg kg⁻¹ CL316,243.

GW9508 (Cayman Chemical) was administered to adult (5 months old) male C57BL6 mice through the diet at a dose calculated to yield an intake of 50 µg g⁻¹ body weight per day GW9508 intake⁵⁵ for 1 week. The diet was prepared as previously described⁵⁶ by soaking diet pellets in an acetone solution of the drug; the control diet in was also soaked in acetone and dried. For cold-exposure treatments, *GPR120*-null, *FGF21*-null and the corresponding wild-type littermates were exposed to 4 °C ambient temperature during the indicated timing. Mice were subjected to non-invasive measurements (see below), and then they were killed, and blood and tissues were collected. Tissue samples were frozen for further RNA and/or protein analysis, or placed in 10% buffered formalin overnight and processed for hematoxylin and eosin (H&E) staining and optical microscopy using standard procedures. The relative lipid content and percentage of multilocular adipocytes were measured from optical microscopy images using ImageJ and CellProfiler software, with at least five independent preparations quantified for each experimental group. Data of the relative lipid content and the area occupied by multilocular adipocytes were expressed as percentages relative to total image area.

The volume of consumed oxygen, the volume of produced carbon dioxide and the respiratory quotient were determined (Harvard Apparatus). Rectal temperature

was determined using an electronic thermistor equipped with a rectal probe. Body temperature was non-invasively estimated by measuring the eye-surface temperature using a high-sensitivity infrared thermography camera (FLIR T335), as previously reported^{57,58}.

All experiments were performed in accordance with European Community Council directive 86/609/EEC and experiments, as well as the number of animals to be used were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the University of Barcelona based on the expected effects size.

Serum biochemistry. Glucose and triglyceride levels were measured using Accutrend Technology (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). FGF21 levels were quantified with ELISA (RD291108200R, Biovendor). Insulin, adipokines and cytokines were quantified using a Multiplex system (MADKMAG-HK, Millipore).

Brown and beige adipocyte cell cultures. Stromal vascular cells were obtained from iBAT and eWAT excised from 3-week-old C57BL6 mice (males and females), primary cultures were generated and the cells were induced to differentiate into brown and beige adipocytes, respectively, following the previously reported procedures^{25,26}. Brown adipocyte differentiation was achieved by exposing confluent precursor cells from iBAT in DMEM/F12 medium containing 10% foetal bovine serum (FBS) and supplemented with 20 nM insulin, 2 nM T3 and 0.1 mM ascorbic acid (ITA).

For beige cell differentiation, confluent precursor cells from iWAT and eWAT were maintained in DMEM/F12 containing 10% newborn calf serum (NCS). For differentiation, 850 nM insulin, 3 µM T3, 35 nM dexamethasone and 10 µM rosiglitazone were added. When indicated, pre-adipocytes were cultured in the presence of delipidated serum (Charcoal Stripped Serum-GIBCO) instead of FBS/NCS.

Cells were treated either across the differentiation process or were treated acutely (24 h), when already differentiated. Treatments included TUG-891 (200 µM), grifolic acid (100 µM), GW9508 (100 µM), ALA (100 µM), EPA (100 µM), NE (0.5 µM), dibutyl-*c*-AMP (1 mM), SB202190 (10 µM), H89 (20 µM), GW7647 (1 µM), GW9662 (30 µM), AH-7614 (100 µM), U-0128 (10 µM), compound C (10 µM), wortmannin (2 µM) and CL316,243 (1 µM). All reagents were obtained from Sigma with the exception of TUG-891, AH-7614, GW9662 (from Tocris), GW9508 (from Cayman Chemical), compound C (Calbiochem) and U-0128 (Enzo). When indicated, cells were subjected to dynamic measurements (see below) and/or further collected for RNA extraction.

Dynamic measurements of adipocytes in culture. Glucose oxidation rates were determined in cultured adipocytes. Cells were incubated for 60 min in the appropriate cell culture medium containing [¹⁴C]-glucose after which trapped [¹⁴C]-CO₂ was measured. Cellular heat production was measured by infrared thermography in accordance with an initial report⁵⁹ further developed for application to brown adipocytes^{27,28}. Basically, brown or beige adipocytes were grown in a 12-well plate and placed on a 37 °C heat block in a polystyrene box coated with black paper to optimize insulation. Images were acquired by an infrared camera (FLIR systems T335, Wilsonville, OR, USA), which detects a 7.5–13 µm spectral response with a thermal sensitivity of 0.1 °C, and analysed using the FLIR Quick Report software (Wilsonville, OR, USA). Supplementary Figure 11 shows an example of thermographic recording of brown adipocytes in culture. Oxygen consumption of cells was recorded using the Oxygen Biosensor System (BD) in the absence or presence (uncoupled respiration) of 10 µg ml⁻¹ oligomycin, and also after exposure of cells to CL316,243 for 24 h, as previously described³⁰.

siRNA-mediated interference. Reverse transfection of differentiated adipocytes was performed using the Lipofectamine RNAiMAX (InvitroGene) and OptiMEM (Life Technologies) reagents, random duplexes or two independent siRNA duplexes designed to silence GPR120 (67928017 and 67928014, final concentration 10 µM), all from Integrated DNA Technologies-TriFECTA. One day after transfection, the cells were exposed to various treatments and then collected for analysis of extracted RNA and conditioned media.

Transient transfection of promoter constructs. Reverse transfection of differentiated brown adipocytes with the plasmid -1497-FGF21-Luc, containing the 5' region of the mouse FGF21 gene linked to the luciferase reporter gene, and the deleted form 69-FGF21-Luc¹⁹ was performed using Lipofectamine. Where indicated, an expression plasmid for a dominant-negative form of MKK6 (MKK6-K82A, Addgene plasmid 13,519) was co-transfected (0.06 µg per well). The pRL-CMV expression plasmid for the sea pansy (*Renilla reniformis*) luciferase was used as an internal transfection control (Promega, Madison, WI, USA). Cells were incubated for 48 h after transfection, and where indicated, they were treated with 100 µM GW9508 or 100 µM EPA for 24 h before collecting. Firefly luciferase activity elicited by FGF21 promoter constructs was normalized for variation in transfection efficiency using Renilla luciferase as an internal standard, all measured in a Turner Designs luminometer (TD 20/20) using the Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega).

Quantitative PCR with reverse transcription. Reverse transcription was performed, using random hexamers primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

and 0.5 µg RNA in a total reaction volume of 20 µl. For PCR, Taqman Gene Expression Assay probes were used (Supplementary Table 3), with reaction mixtures containing 1 µl cDNA, 10 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 250 nM probes and 900 nM of primers from the Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix. The 18S rRNA was measured as the housekeeping reference gene. The mRNA level of the gene of interest in each sample was normalized to that of the reference control using the comparative ($2^{-\Delta\text{CT}}$) method, according to the manufacturer's instructions. A transcript was considered to be non-detectable when $\text{CT} \geq 40$.

Immunoblots and multiplex protein assays. Western blot analysis of tissue and cell culture extracts was performed following standard procedures, using primary anti-UCP1 (1:1,000 ab10983, Abcam, Cambridge, UK) and anti-GPR120 (1:150sc-99105, Santa Cruz, USA). Specificity of GPR120 detection was checked using BAT extracts from male C57BL6 *GPR120*-null mice (Supplementary Fig. 12). Loading controls were established using α -tubulin immunoblots (T9026, Sigma-Aldrich) or Ponceau staining of membranes. Immunoreactive proteins were detected using an ECL (enhanced chemiluminescence) system (GE Healthcare). Signal intensities were quantified by scanning densitometry (Phoretics 1D Software). Uncropped scans of western blots and corresponding Ponceau-stained membranes, including scale markers are shown in Supplementary Fig. 13. Quantitative measurements of changes in phosphorylated ERK1/2, CREB and p38 MAPK were performed using multiplex-based technology (48–680MAG and 48–681MAG kits, Millipore, Billerica, MA, USA) by determining the ratio of the corresponding phosphoproteins relative to total specific proteins.

Statistics. Two-tailed unpaired Student's *t*-test or one-way analysis of variance were used to test for the statistical significance of differences between two experimental conditions. Welch's correction was applied when unequal variances were detected by *F*-test, using the GraphPad statistical software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Statistical significance was set with an α -value of $P < 0.05$, and underlying assumptions for validity of all tests were assessed. Data are shown as means \pm s.e.m.

Data availability. The raw data generated during the RNA-seq procedure is deposited in Gene Expression Omnibus (GEO) under accession number GSE77534. The complete list of cold-modulated genes in BAT after RNA-seq data analysis is available at <http://lmedex.ulb.ac.be/data.php>.

References

- Lowell, B. B. *et al.* Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* **366**, 740–742 (1993).
- Feldmann, H. M., Golozoubova, V., Cannon, B. & Nedergaard, J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab.* **9**, 203–209 (2009).
- Betz, M. J. & Enerbäck, S. Human brown adipose tissue: what we have learned so far. *Diabetes* **64**, 2352–2412 (2015).
- Giralt, M. & Villarroya, F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology* **154**, 2992–3000 (2013).
- Shabalina, I. G. *et al.* UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep.* **5**, 1196–1399 (2013).
- Kazak, L. *et al.* A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat. *Cell* **163**, 643–698 (2015).
- Plaisier, C. L. *et al.* Zbtb16 has a role in brown adipocyte bioenergetics. *Nutr. Diabetes* **2**, e46 (2012).
- Rosell, M. *et al.* Brown and white adipose tissues: intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **306**, E945–E964 (2014).
- Sultan, M. *et al.* A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science* **321**, 956–1016 (2008).
- Tang, F. *et al.* RNA-Seq analysis to capture the transcriptome landscape of a single cell. *Nat. Protoc.* **5**, 516–551 (2010).
- van Bakel, H., Nislow, C., Blencowe, B. J. & Hughes, T. R. Most 'dark matter' transcripts are associated with known genes. *PLoS Biol.* **8**, e1000371 (2010).
- Ulven, T. & Christiansen, E. Dietary fatty acids and their potential for controlling metabolic diseases through activation of FFA4/GPR120. *Annu. Rev. Nutr.* **35**, 239–263 (2015).
- Oh, D. Y. *et al.* GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* **142**, 687–785 (2010).
- Ichimura, A. *et al.* Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature* **483**, 350–354 (2012).
- Hao, Q. *et al.* Transcriptome profiling of brown adipose tissue during cold exposure reveals extensive regulation of glucose metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **308**, E380–E392 (2015).
- Iwasaki, K. *et al.* Free fatty acid receptor GPR120 is highly expressed in enteroendocrine K cells of the upper small intestine and has a critical role in GIP secretion after fat ingestion. *Endocrinology* **156**, 837–883 (2015).
- Gotoh, C. *et al.* The regulation of adipogenesis through GPR120. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**, 591–597 (2007).
- Cao, W., Medvedev, A. V., Daniel, K. W. & Collins, S. beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 27077–27082 (2001).
- Hondares, E. *et al.* Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **286**, 12983–12990 (2011).
- Wu, J. *et al.* Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**, 366–442 (2012).
- Hirasawa, A. *et al.* Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat. Med.* **11**, 90–94 (2005).
- Suh, H. N., Huong, H. T., Song, C. H., Lee, J. H. & Han, H. J. Linoleic acid stimulates gluconeogenesis via Ca²⁺/PLC, cPLA2, and PPAR pathways through GPR40 in primary cultured chicken hepatocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **295**, 1518–1545 (2008).
- Gavaldà-Navarro, A. *et al.* Fibroblast growth factor 21 in breast milk controls neonatal intestine function. *Sci. Rep.* **5**, 13717 (2015).
- Wu, Q. *et al.* Identification of G-protein-coupled receptor 120 as a tumor-promoting receptor that induces angiogenesis and migration in human colorectal carcinoma. *Oncogene* **32**, 5541–5550 (2013).
- Barbera, M. J. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J. Biol. Chem.* **276**, 1486–1579 (2001).
- Schlüter, A., Barberá, M. J., Iglesias, R., Giralt, M. & Villarroya, F. Phytanic acid, a novel activator of uncoupling protein-1 gene transcription and brown adipocyte differentiation. *Biochem. J.* **362**, 61–70 (2002).
- Lee, P., Werner, C. D., Kebebew, E. & Celi, F. S. Functional thermogenic beige adipogenesis is inducible in human neck fat. *Int. J. Obes. (Lond)* **38**, 170–176 (2014).
- Lee, P. *et al.* Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans. *Cell Metab.* **19**, 302–309 (2014).
- Hudson, B. D. *et al.* The pharmacology of TUG-891, a potent and selective agonist of the free fatty acid receptor 4 (FFA4/GPR120), demonstrates both potential opportunity and possible challenges to therapeutic agonism. *Mol. Pharmacol.* **84**, 710–735 (2013).
- Hara, T. *et al.* Novel selective ligands for free fatty acid receptors GPR120 and GPR40. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **380**, 247–302 (2009).
- Aune, U. L., Ruiz, L. & Kajimura, S. Isolation and differentiation of stromal vascular cells to beige/brite cells. *J. Vis. Exp.* **73**, 50191 (2013).
- Badman, M. K. *et al.* Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab.* **5**, 426–437 (2007).
- Inagaki, T. *et al.* Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab.* **5**, 415–425 (2007).
- Sparks, S. M. *et al.* Identification of diarylsulfonamides as agonists of the free fatty acid receptor 4 (FFA4/GPR120). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 3100–3103 (2014).
- Raingaud, J. *et al.* MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell Biol.* **16**, 1247–1255 (1996).
- Hondares, E. *et al.* Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab.* **11**, 206–212 (2010).
- Fisher, F. M. *et al.* FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* **26**, 271–281 (2012).
- Villarroya, F. & Vidal-Puig, A. Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. *Cell Metab.* **17**, 638–643 (2013).
- Oh, D. L. *et al.* A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice. *Nat. Med.* **20**, 942–949 (2014).
- Qiu, Y. *et al.* Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell* **157**, 1292–1308 (2014).
- Rao, R. R. *et al.* Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell* **157**, 1279–1291 (2014).
- Flachs, P., Rossmeis, M. & Kopecky, J. The effect of n-3 fatty acids on glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Physiol. Res.* **63**, S93–S118 (2014).
- Oudart, H. *et al.* Brown fat thermogenesis in rats fed high-fat diets enriched with omega polyunsaturated fatty acids. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **21**, 955–1017 (1997).
- Sadurskis, A., Dicker, A., Cannon, B. & Nedergaard, J. Polyunsaturated fatty acids recruit brown adipose tissue: increased UCP content and NST capacity. *Am. J. Physiol.* **269**, e351–e411 (1995).

45. Takahashi, Y. & Ide, T. Dietary omega fatty acids affect mRNA level of brown adipose tissue uncoupling protein 1, and white adipose tissue leptin and glucose transporter 4 in the rat. *Br. J. Nutr.* **84**, 175–259 (2000).
46. Flachs, P. *et al.* Synergistic induction of lipid catabolism and anti-inflammatory lipids in white at of dietary obese mice in response to calorie restriction and omega fatty acids. *Diabetologia* **54**, 2626–2664 (2011).
47. Villarroya, J. *et al.* Fibroblast growth factor-21 and the beneficial effects of long-chain omega polyunsaturated fatty acids. *Lipids* **49**, 1081–1090 (2014).
48. Fleckenstein-Elsen, M. *et al.* Eicosapentaenoic acid and arachidonic acid differentially regulate adipogenesis, acquisition of a brite phenotype and mitochondrial function in primary human adipocytes. *Mol. Nutr. Food Res.* **60**, 2065–2075 (2016).
49. Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 57–63 (2009).
50. Eizirik, D. L. *et al.* The human pancreatic islet transcriptome: expression of candidate genes for type 1 diabetes and the impact of pro-inflammatory cytokines. *PLoS Genet.* **8**, e1002552 (2012).
51. Cnop, M. *et al.* RNA sequencing identifies dysregulation of the human pancreatic islet transcriptome by the saturated fatty acid palmitate. *Diabetes* **63**, 1978–1993 (2014).
52. Trapnell, C. *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* **28**, 511–516 (2010).
53. Montgomery, S. B. *et al.* Transcriptome genetics using second generation sequencing in a Caucasian population. *Nature* **464**, 773–780 (2010).
54. Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L. & Wold, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* **5**, 621–628 (2008).
55. Ou, H. Y. *et al.* Multiple mechanisms of GW-9508, a selective G protein-coupled receptor 40 agonist, in the regulation of glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **304**, E668–E676 (2013).
56. Cabrero, A. *et al.* Bezafibrate reduces mRNA levels of adipocyte markers and increases fatty acid oxidation in primary culture of adipocytes. *Diabetes* **50**, 1883–1890 (2001).
57. Johnson, S., Rao, S., Hussey, S. B., Morley, P. S. & Traub-Dargatz, J. L. Thermographic eye temperature as an index to body temperature in ponies. *J. Equine. Vet. Sci.* **31**, 63–66 (2011).
58. Purslow, C. & Wolffsohn, J. S. The relation between physical properties of the anterior eye and ocular surface temperature. *Optom. Vis. Sci.* **84**, 197–201 (2007).
59. Paulik, M. A. *et al.* Development of infrared imaging to measure thermogenesis in cell culture: thermogenic effects of uncoupling protein-2, troglitazone, and beta-adrenoceptor agonists. *Pharm. Res.* **15**, 944–949 (1998).

Acknowledgements

We thank A. Peró and M. Morales for technical support. Scientific and technical advice by Dr C. Wolfrum and M. Christian is acknowledged. This work has been supported by Grants SAF2014-55725 and PI14/00063 from the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), Spain, and co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF), and by the European Community's Seventh Framework Program (FP7 BetaBat for F.V. and D.L.E.) and the Horizon 2020 Program (T2Dsystems (GA667191)) to D.L.E. T.Q.-L. was supported by a CONACyT (National Council for Science and Technology in Mexico) Ph. D. scholarship. R.M. and M.C. were supported by PhD scholarships from MINECO, Spain.

Authors contributions

The experiments were conceived and designed by T.Q.-L., D.L.E. and F.V.; RNA-seq data were obtained and analysed by J.-V.T., R.C. and D.L.E.; experiments with mice were performed by T.Q.-L., R.M., A.P. and R.I.; cell culture experiments were performed by T.Q.-L., M.G., M.P. and A.G.-N.; analysis of microscopy images was performed by M.C. and M.G.; overall data were analysed by T.Q.-L., M.G., D.L.E. and F.V. The paper was written by F.V. and revised/approved by all contributors.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

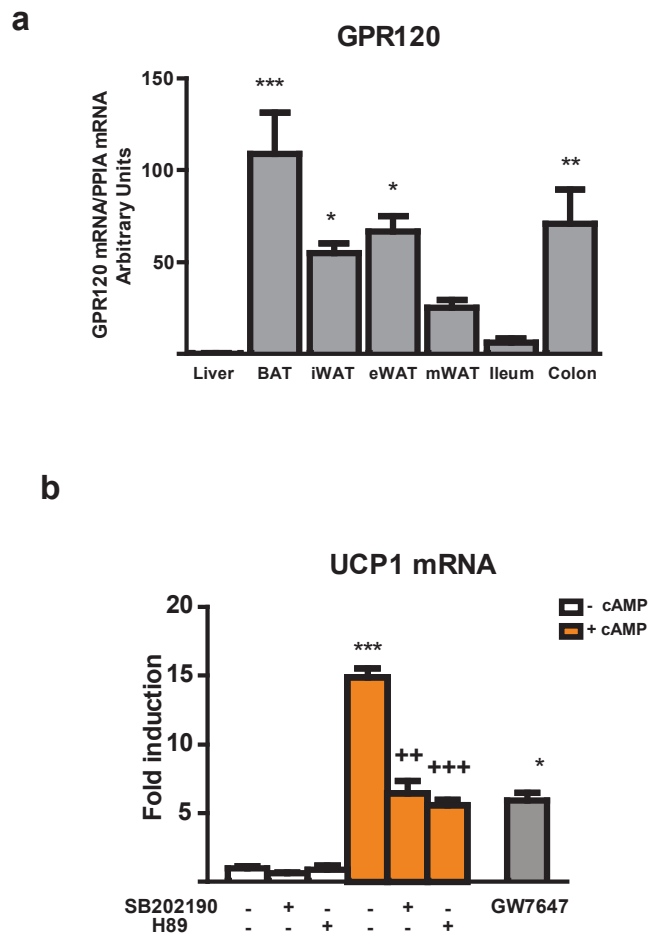
How to cite this article: Quesada-López, T. *et al.* The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes. *Nat. Commun.* **7**, 13479 doi: 10.1038/ncomms13479 (2016).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

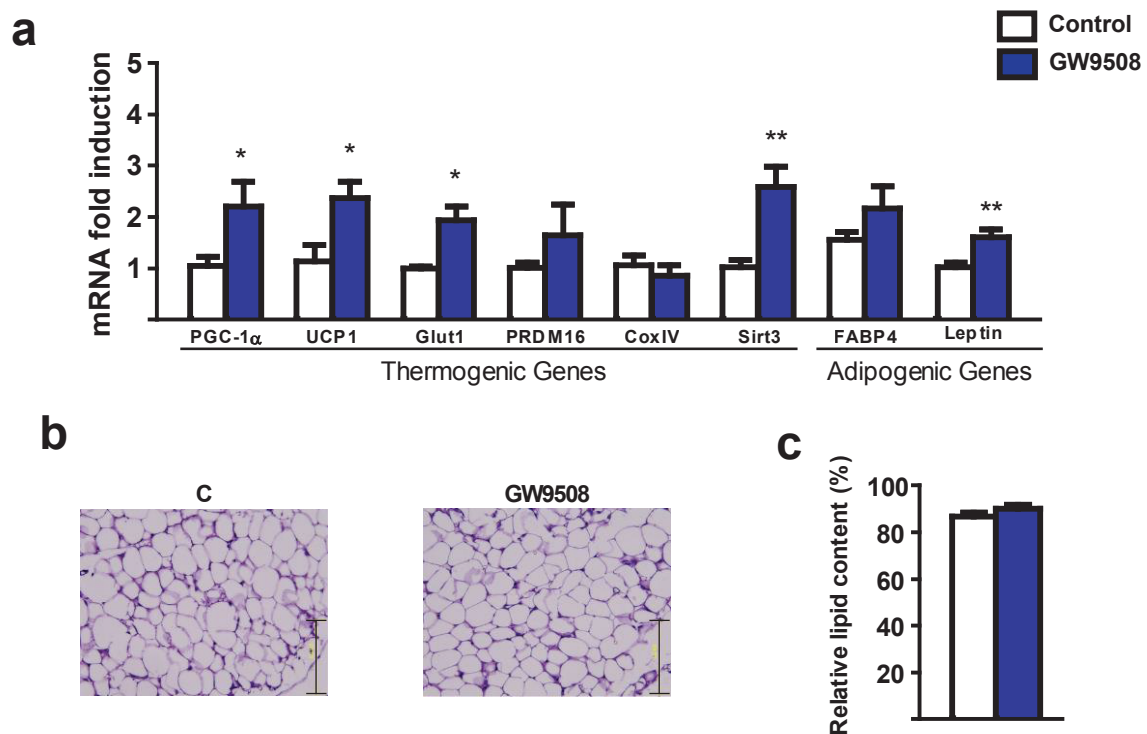


This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

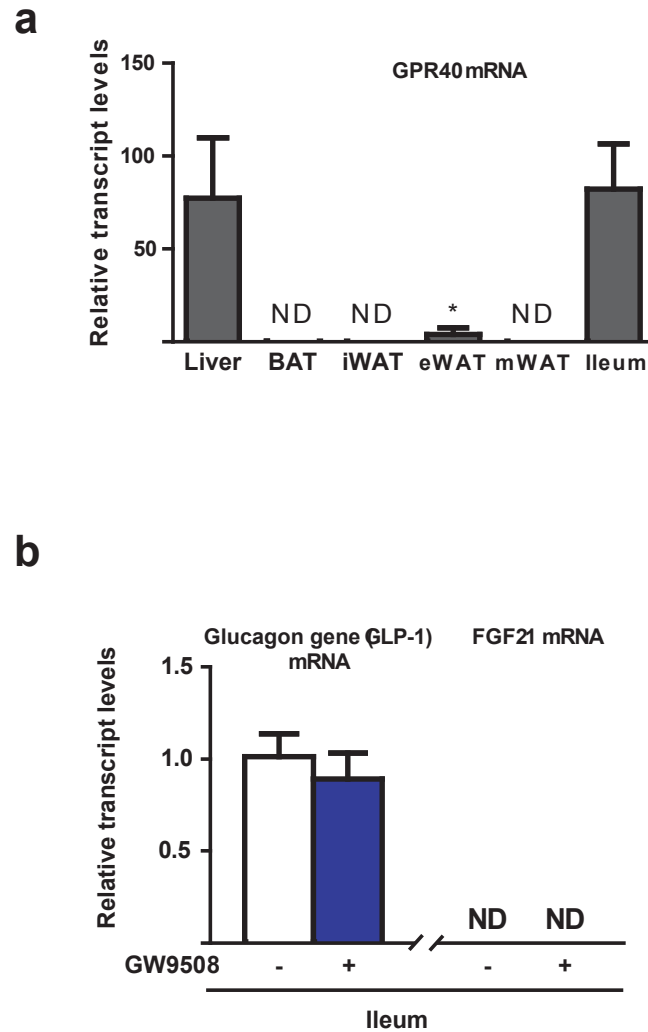
© The Author(s) 2016



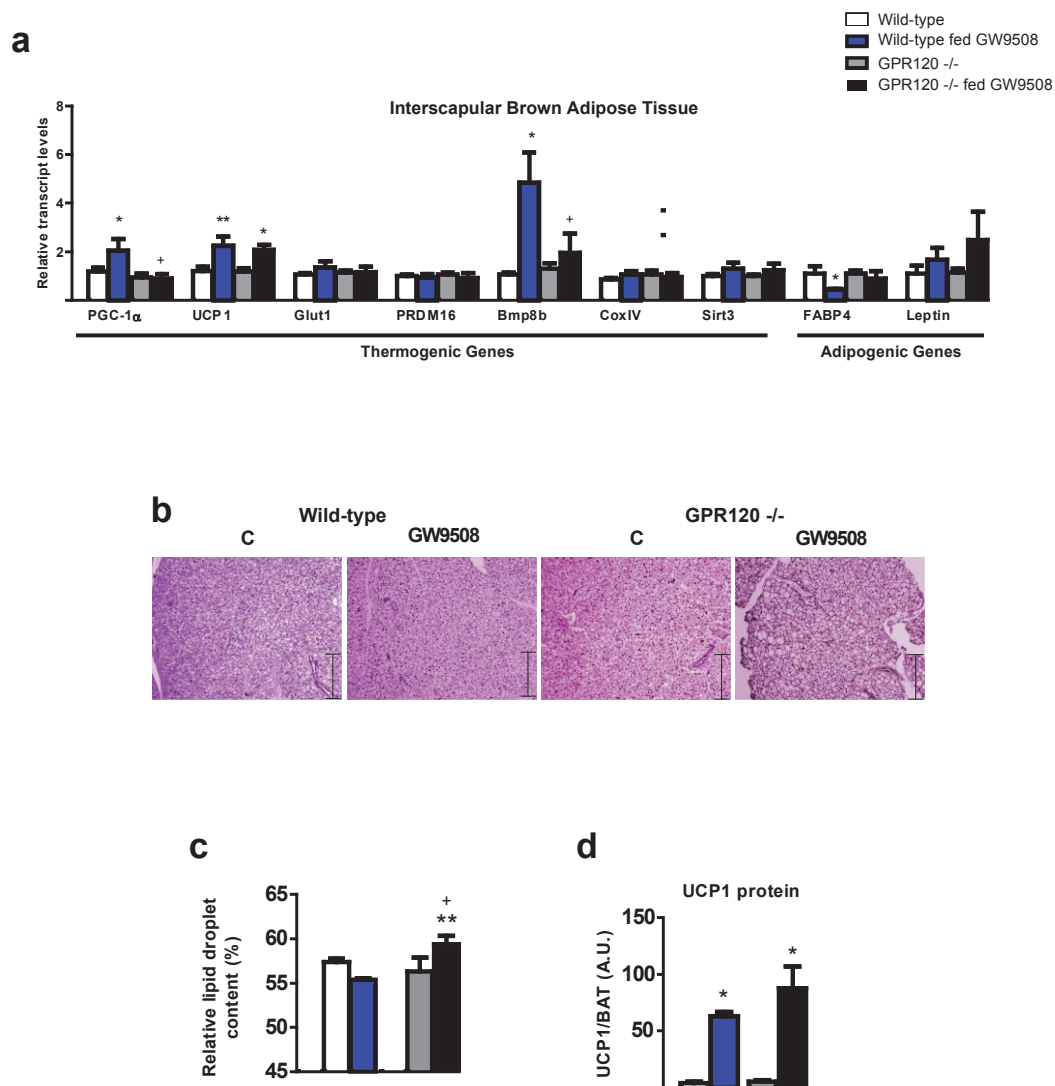
Supplementary Figure 1. GPR120 expression and effects of p38 MAPK and PKA inhibitors and PPAR α agonist on UCP1 mRNA levels. (a) *GPR120* mRNA expression in mouse tissues using cyclophilin mRNA as housekeeping reference gene. Bars are means + s.e.m. (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 compared with ileum; two-tailed unpaired student t-test). (b) Effects of 10 μ M SB202190 (a p38 MAPK inhibitor), or 20 μ M H89 (a PKA inhibitor) on the up-regulation of *UCP1* mRNA in response to 1mM dibutyryl-cAMP, and effects of 1 μ M GW7647 (PPAR α agonist) in brown adipocytes differentiated in primary culture (n = 4). Bars are means + s.e.m. (* P < 0.05, *** P < 0.001 compared with controls; ++ P < 0.01, +++ P < 0.001 for the effects of SB202190 or H89; ANOVA with Tukey's post hoc test).



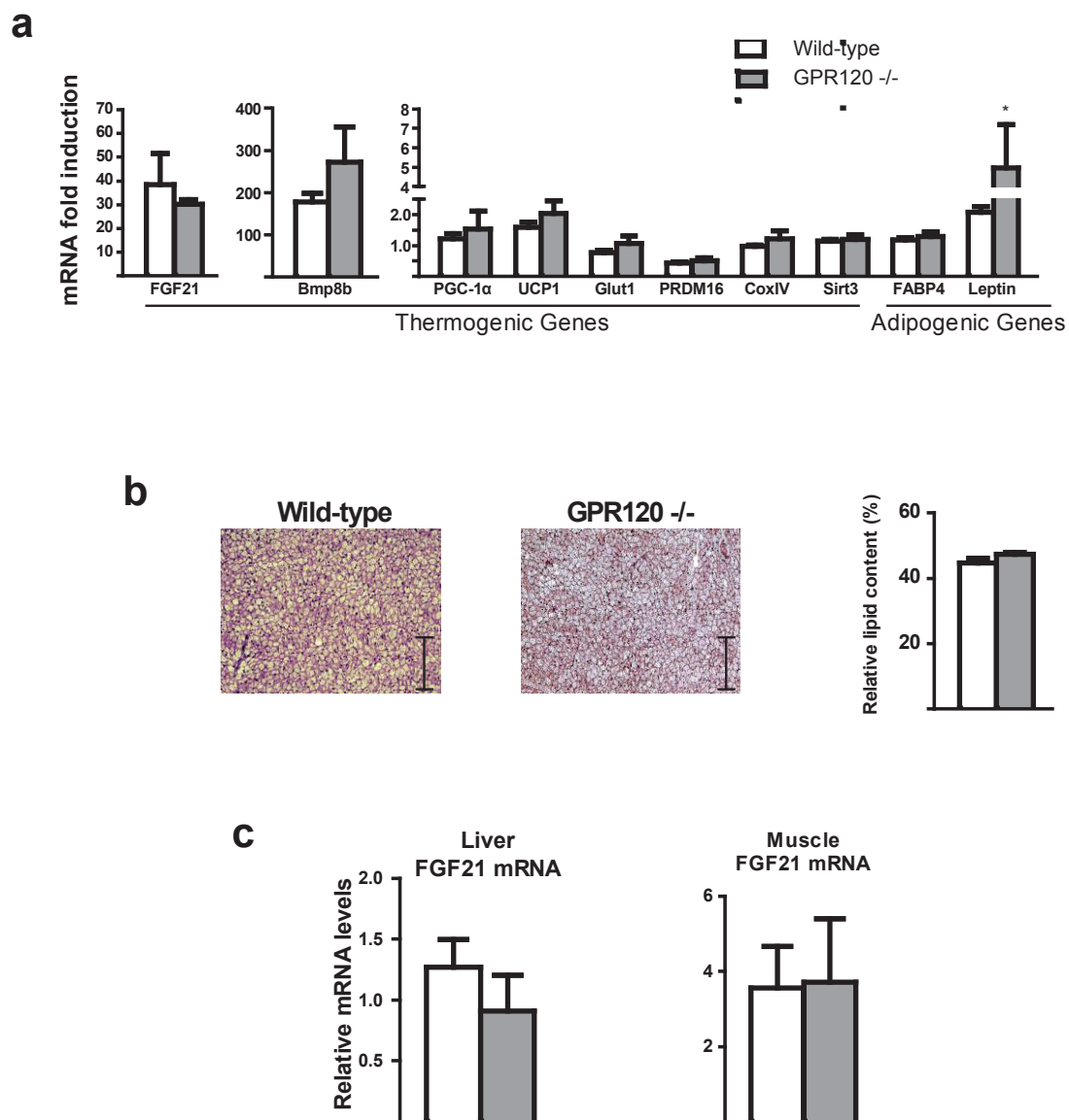
Supplementary Figure 2. Effects of GW9508 on thermogenic genes in epididymal WAT. Adult mice were fed for 7 days a control diet (white bars) or a diet supplemented with GW9508 (blue bars) (n = 6). **(a)** Relative expression levels of thermogenic and adipogenic genes in eWAT, **(b)** representative optical microscopy images from H&E-stained eWAT (scale, 125 μ m), **(c)** relative lipid content. Bars are means + s.e.m. (* P <0.05 and ** P <0.01 relative to untreated control mice; two-tailed unpaired student t-test).



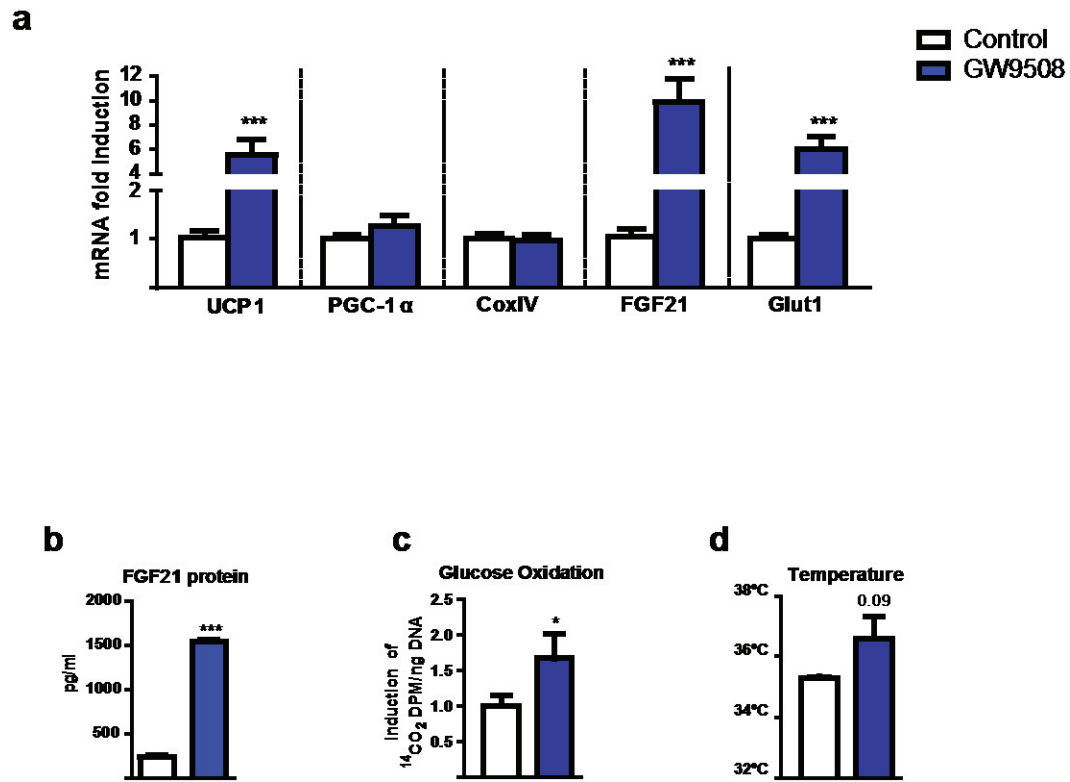
Supplementary Figure 3. GPR40 mRNA expression levels in adipose depots and GW9508 effect on intestinal cells. (a) *GPR40* mRNA expression levels in mouse tissues (n = 4). **(b)** Relative expression levels of *GLP-1* and *FGF21* in Ileum from adult mice fed for 7 days a control diet (white bars) or a diet supplemented with GW9508 (blue bars). Bars are means + s.e.m. (* $P < 0.05$ relative to liver *GPR40* mRNA expression; two-tailed unpaired student t-test).



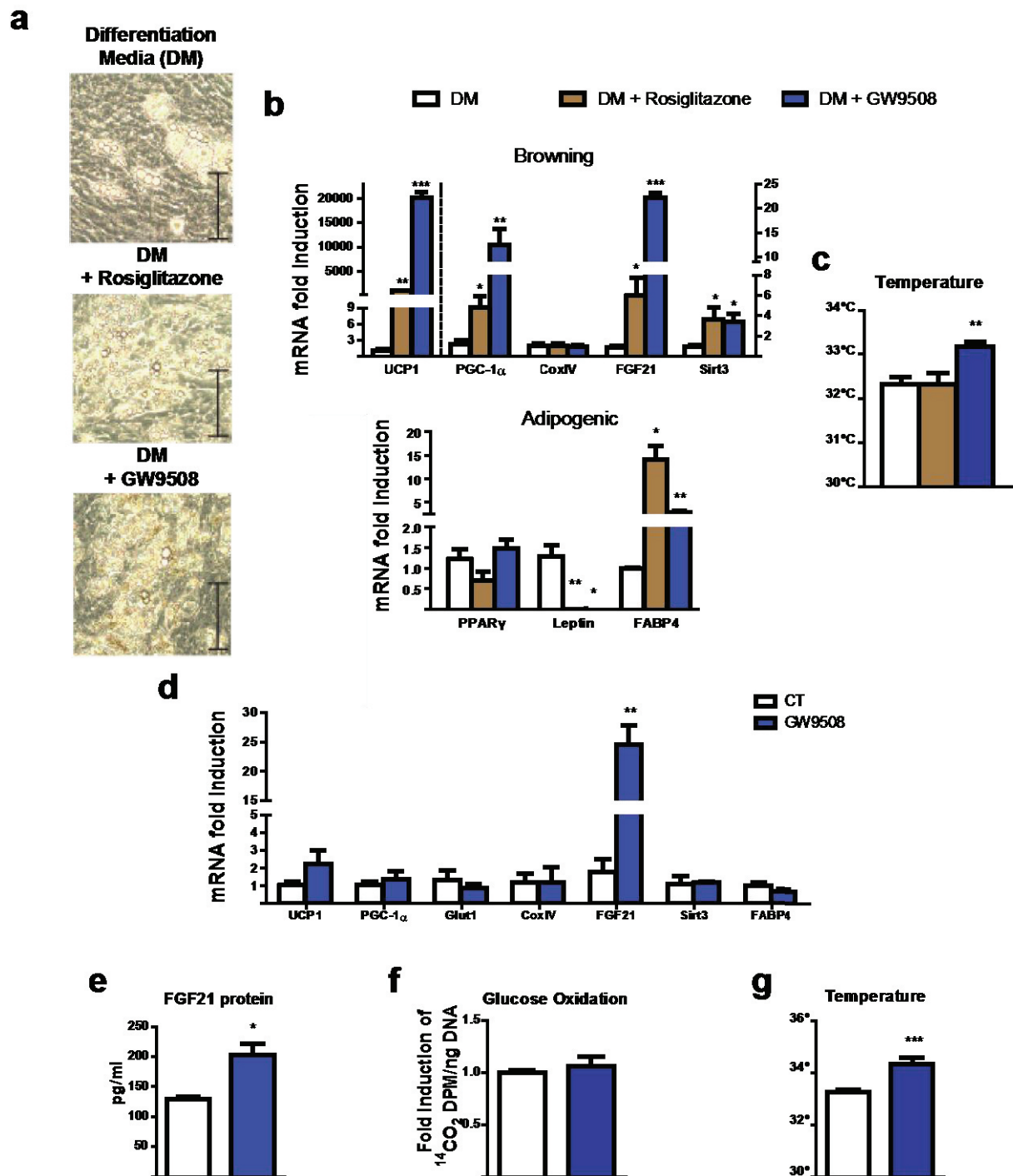
Supplementary Figure 4. Effects of GPR120 gene invalidation on the response to GW9508 treatment in iBAT. Wild-type and GPR120 $-/-$ mice (n = 5) were fed for 7 days a control diet (white and grey bars, respectively) or a diet supplemented with GW9508 (blue and black bars, respectively). **(a)** Relative expression levels of thermogenic and adipogenic genes in iBAT. **(b)** Representative optical microscopy from H&E-stained iBAT (scale, 200 μ m), **(c)** relative lipid content, **(d)** UCP1 protein levels. Bars are means + s.e.m. (*P<0.05, **P<0.01, and ***P<0.001 relative to untreated mice of each genotype; +P<0.05, ++P<0.01 relative to the effects of the genotype in mice under the same treatment; ANOVA with Tukey's post hoc test).



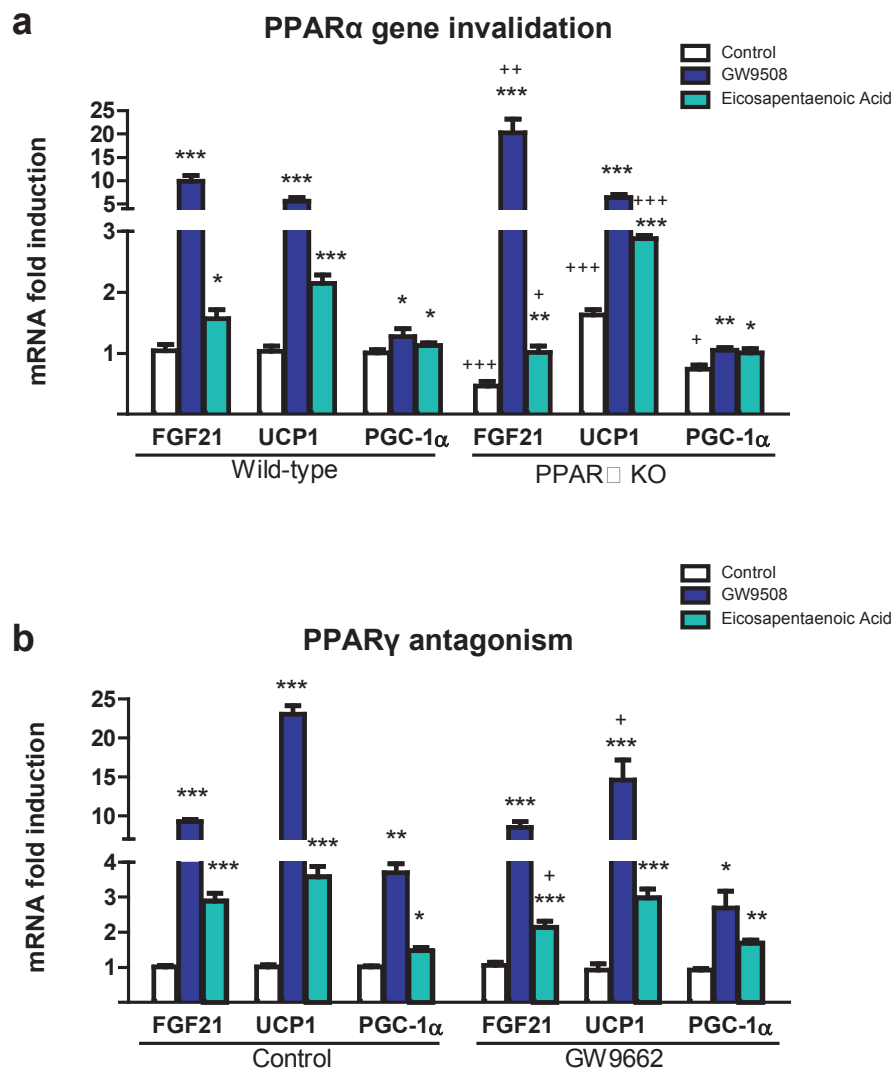
Supplementary Figure 5. Effects of GPR120 invalidation on iBAT from mice exposed to cold. *Wild-type* (white bars) and *GPR120*^{-/-} (grey bars) mice were exposed to cold (4°C) for 7 days (n=5). **(a)** Relative expression levels of thermogenic and adipogenic genes in iBAT. **(b)** Representative images of H&E-stained iBAT (scale, 125µm) and the relative lipid droplet content. **(c)** *FGF21* mRNA expression levels in liver and skeletal muscle. Bars are means + s.e.m. (*P<0.05, relative to wild-type control mice; two-tailed unpaired student t-test).



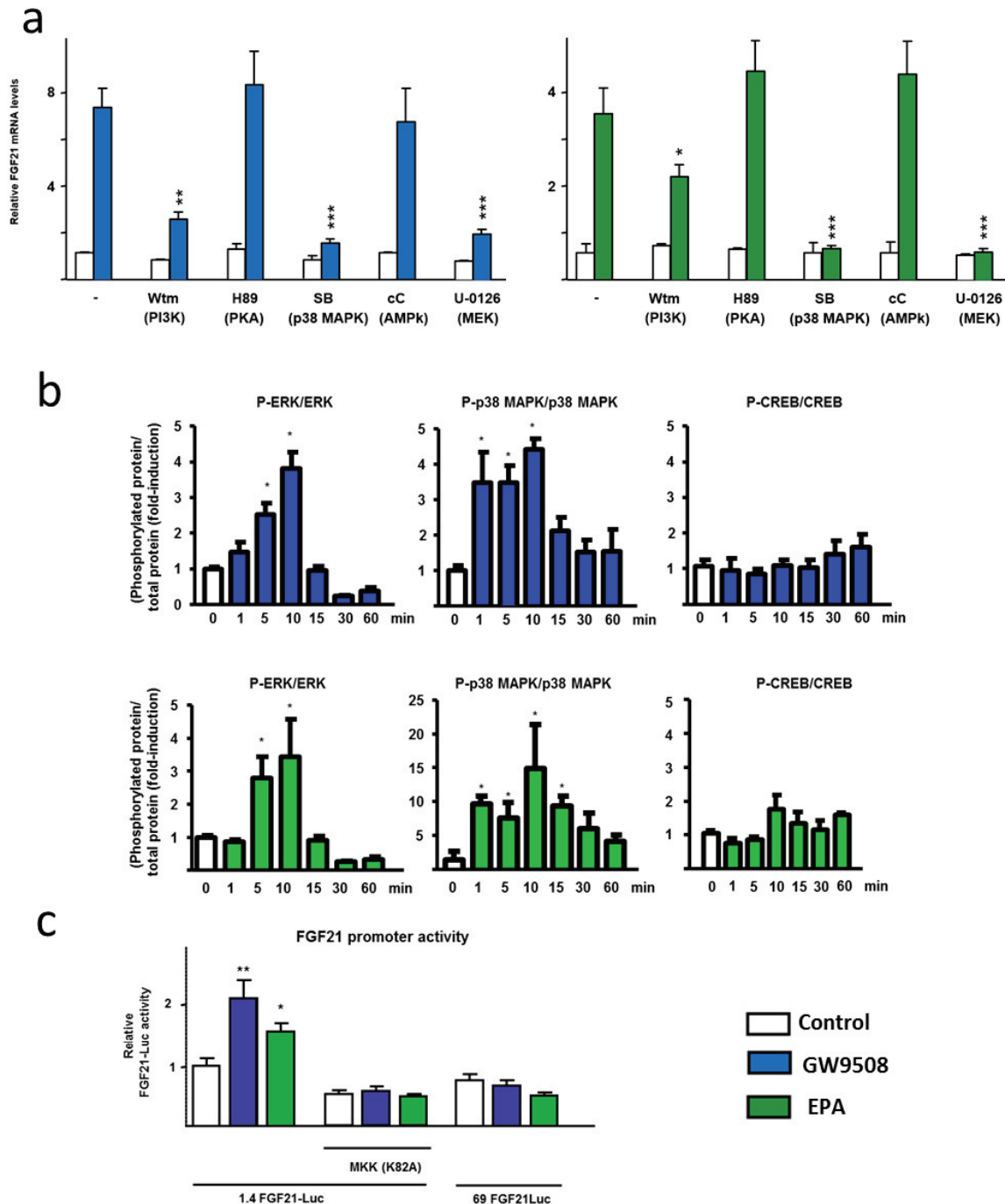
Supplementary Figure 6. GPR120 activation induces thermogenesis-related genes expression, glucose oxidation and FGF21 protein release in brown adipocytes. iBAT precursors were differentiated and treated for 24h with 100 μ M GW9508 (n = 5) **(a)** Relative expression levels of *UCP1*, *PGC-1 α* , *CoxIV*, *FGF21* and *Glut1*. **(b)** FGF21 protein in supernatant (24h accumulation). **(c)** Glucose oxidation rate. **(d)** Cell culture temperature. Bars are means + s.e.m. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ relative to untreated control cells; two-tailed unpaired student t-test).



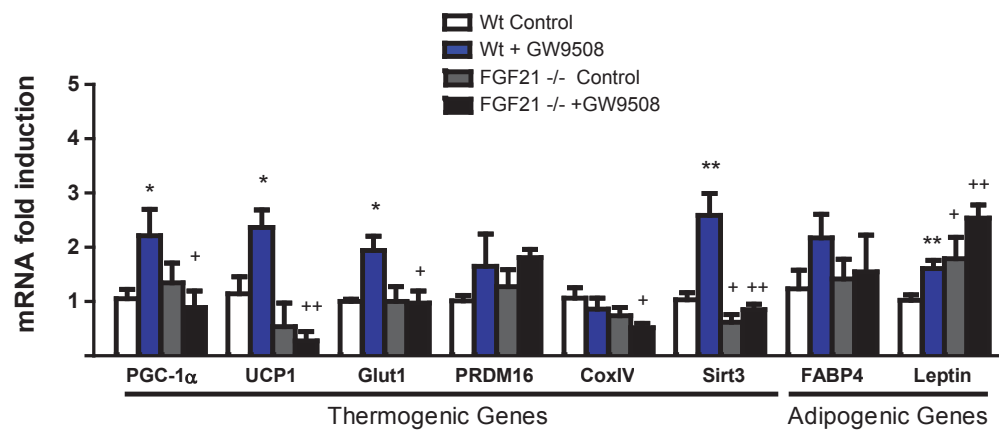
Supplementary Figure 7. GPR120 activation promotes eWAT derived beige adipocyte differentiation and increases FGF21 expression and release. For a-c, eWAT precursors from wild-type mice were differentiated (n=3-5) in the presence of the differentiation media (DM) (n=3), supplemented with rosiglitazone to drive beige differentiation (DM + Rosiglitazone)(n=5), or treated with GW9508 instead of rosiglitazone (DM + GW9508) (n=5) (see Methods section). **(a)** Representative optical microscopy images at the end of differentiation (day 7) (scale bar, 200μm). **(b)** Relative mRNA expression levels of browning-related and general adipogenic genes. **(c)** Cell culture temperature. For d-g, eWAT precursors from *wild-type* mice were differentiated and treated during 24h with GW9508 (100μM) (n=5). **(d)** mRNA expression levels of *UCP1*, *PGC-1α*, *Glut1*, *COXIV*, *FGF21*, *Sirt3*, and *FABP4*. **(e)** FGF21 protein levels in culture media (24h accumulation). **(f)** Glucose oxidation rate. **(g)** Cell culture temperature. Bars are means + s.e.m. (*P<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001 versus controls; two-tailed unpaired student t-test).



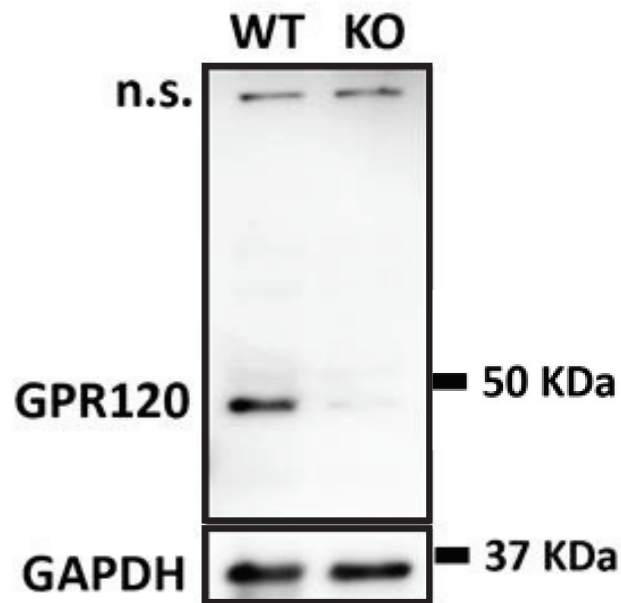
Supplementary Figure 8. Involvement of the PPAR α and PPAR γ pathways in the FGF21 induction elicited by activation of GPR120. (a) iBAT precursors from *wild-type* and *PPAR α -null* mice were differentiated and treated during 24h with GW9508 (100 μ M) or EPA (100 μ M). Relative mRNA expression for *FGF21*, *UCP1* and *PGC-1 α* is shown (n = 3). (b) iBAT precursors from *wild-type* mice were differentiated and treated with GW9508 or EPA and the PPAR γ antagonist (GW9662). Relative mRNA expression for *FGF21*, *UCP1* and *PGC-1 α* is shown (n = 3). Bars are means + s.e.m. (*P<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001 versus controls; +P<0.05, ++p<0.01, and +++p<0.001 PPAR α -null cells or GW9662 treated cells; ANOVA with Tukey's post hoc test).



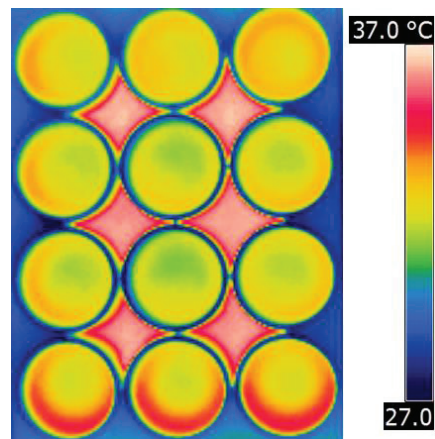
Supplementary Figure 9. Effects of GW9508 or EPA on FGF21 mRNA expression in the presence of kinases inhibitors, phosphorylation of regulatory kinases, and FGF21 gene promoter activity. Brown adipocytes in culture were used. **(a)** *FGF21* mRNA expression after 24h treatment with GW9508 (100µM) or EPA (100µM) in the presence of 2 µM wortmannin (PI3K inhibitor), 10 µM compound C (AMP kinase inhibitor), 10 µM SB202190 (p38 MAPK inhibitor), 20 µM H89 (PKA inhibitor), 10 µM U-0128 (ERK inhibitor) (n = 4). **(b)** Relative levels of phosphorylated versus total kinases in response to GW9508 or EPA at the indicated times of treatment (n = 3). **(c)** *Wild-type* (1.4 FGF21-Luc) and *deleted* (69-FGF21-Luc) FGF21 gene promoter activity in transfected brown adipocytes in response to GW9508 or EPA. Effects of co-transfection with the dominant negative form of MKK6 (K82A) (n = 4). Bars are means + s.e.m. (*P<0.05, versus controls in the absence of inhibitors in (a), and versus non-treated cells in (b) and (c); for a, Student's t test was used and for b and c, ANOVA and Tukey post-hoc tests.



Supplementary Figure 10. Impaired effects of GW9508 on FGF21-null beige adipocytes derived from eWAT. eWAT precursors from *wild-type* and *FGF21-null* mice were differentiated and treated with GW9508 (24h) (n = 5), mRNA expression levels of thermogenic and adipogenic genes are shown. Bars are means + s.e.m. (*P<0.05, **P<0.01, for the effects of GW9508; and +P<0.05, ++P<0.01, for comparisons between *wild-type* and *FGF21-null* cells; ANOVA with Tukey's post hoc test).

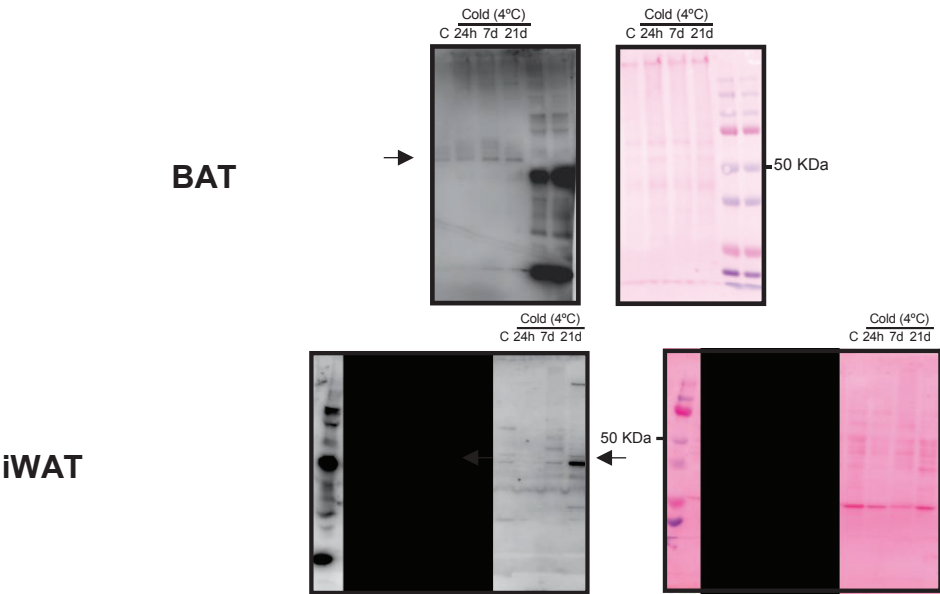


Supplementary Figure 11. Validation of specificity of GPR120 detection by immunoblot using BAT from GPR120-null mice. The Figure shows a representative western blot of 20 μ g of protein extracts from mouse iBAT from *wild-type* (WT) and *GPR120-null* (KO) mice probed with the sc-99105 rabbit anti-GPR120 antibody (1:150) (Santa Cruz, USA). N.s., non-specific. GAPDH, probing of the membrane with the loading control GAPDH (1:3000) to ensure equal loading of lanes.

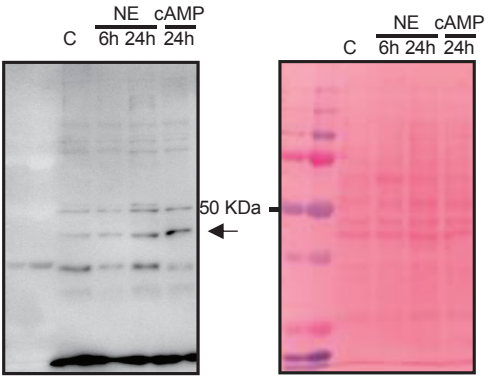


Supplementary Figure 12. Methodology for infrared thermography of brown adipocytes in culture. Example of thermographic recording of brown adipocytes in culture as described in Methods.

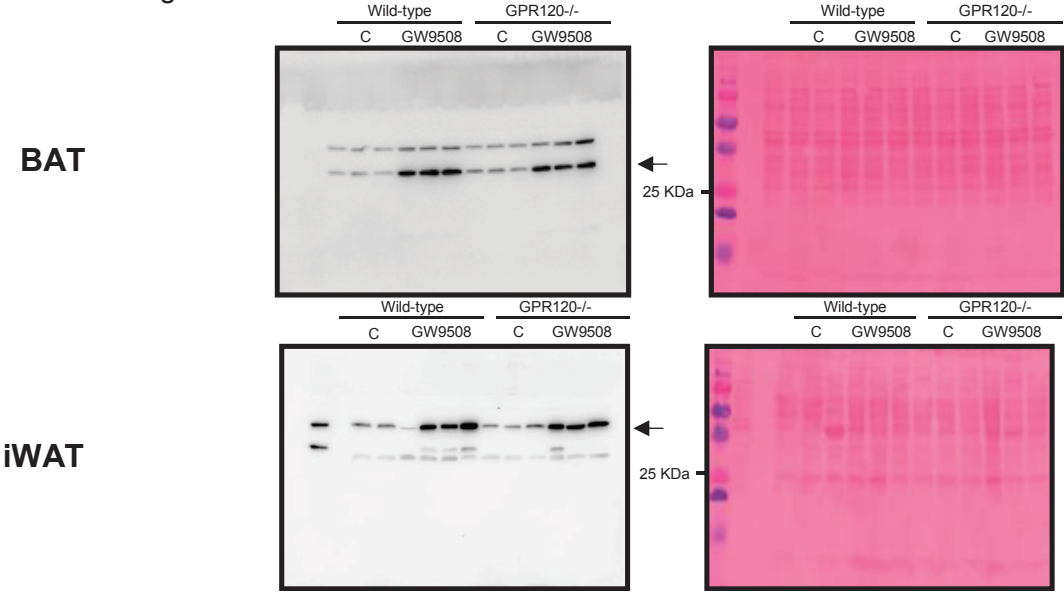
Western blot figure 1 b:



Western blot figure 1 f:



Western blot figure 2:



Supplementary Figure 13. Uncropped western blots and markers. Immunoblots (left) and Ponceau-stained membranes showing weight markers (right). Arrow, specific immunoblot signal. Black areas, lanes unrelated to current study.

Supplementary Table 1. Tissue weight, body temperature and circulating metabolic and hormonal parameters in mice treated with dietary GW9508 for 7 days Adult mice were fed a standard chow diet supplemented with or without GW9508 for 7 days. Data are means \pm s.e.m. (*P<0.05 relative to untreated control mice; two-tailed unpaired student t-test).

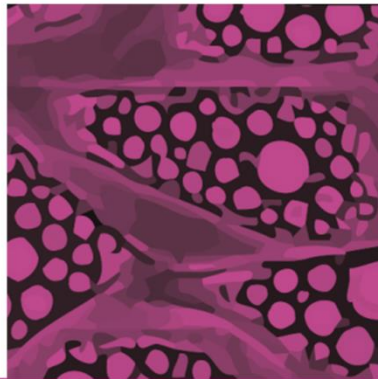
	<u>Control (n=5)</u>	<u>GW9508(n=6)</u>
Body Weight (g)	29.0 \pm 0.8	27,6 \pm 0.6
Food intake (g)	6.4 \pm 0.7	4.8 \pm 0.6
iBAT (mg)	99.4 \pm 7.8	96.0 \pm 3.1
iWAT (mg)	95.4 \pm 14	100.2 \pm 11.8
eWAT (mg)	180.0 \pm 24.7	181.1 \pm 25.9
mWAT (mg)	169.1 \pm 27.5	133.4 \pm 13.0
Rectal temperature (°C)	35.7 \pm 0.4	35.8 \pm 0.4
Core temperature (eye) (°C)	35.9 \pm 0.5	35.6 \pm 0.3
Glucose (mg/dL)	183 \pm 10	157 \pm 14
Triglycerides (mg/dL)	140 \pm 14	169 \pm 12
Insulin (pg/dL)	966 \pm 99	633 \pm 62 *
IL-6 (pg/dL)	54 \pm 39	27 \pm 11
Leptin (pg/dL)	1090 \pm 382	1374 \pm 324
PAI1 (pg/dL)	1168 \pm 334	1579 \pm 329
Resistin (pg/dL)	1930 \pm 130	1971 \pm 171

Supplementary Table 2. Tissue weight, body temperature and circulating metabolic and hormonal parameters in wild-type mice and GPR120-null mice treated with dietary GW9508 for 7 days Adult mice were fed a standard chow diet supplemented with or without GW9508 for 7 days. Data are means \pm s.e.m. (*P<0.05 relative to untreated control mice; ANOVA with Tukey's post hoc test).

	<u>Wild-type</u>		<u>GPR120^{-/-}</u>	
	<u>Control</u>	<u>GW9508</u>	<u>Control</u>	<u>GW9508</u>
Body weight (g)	27.7 \pm 0.6	27.0 \pm 0.6	26.9 \pm 0.5	27.4 \pm 0.3
Food intake (g)	4.0 \pm 0.2	4.5 \pm 0.1	4.3 \pm 0.1	4.1 \pm 0.21
iBAT (mg)	83.7 \pm 1.8	97.4 \pm 15.5	90.6 \pm 5.4	91.6 \pm 7.4
iWAT (mg)	147.6 \pm 10.0	205.5 \pm 3.0	133.4 \pm 7.3	204.0 \pm 31.9
eWAT(mg)	264.6 \pm 15.3	440.5 \pm 143.5	228.8 \pm 21.5	433.8 \pm 50.0
Core temperature (eye) (°C)	35.8 \pm 0,5	35.6 \pm 0,3	36.2 \pm 0,18	36.0 \pm 0.2
Glucose (mg/dL)	195 \pm 11	185 \pm 8	170 \pm 9	174 \pm 17
Triglycerides (mg/dL)	159 \pm 13	138 \pm 7	157 \pm 9	160 \pm 19
Insulin (pg/dL)	1520 \pm 45	996 \pm 96 *	1110 \pm 350	1200 \pm 180

Supplementary Table 3. TaqMan probes (Applied Biosystems) used for RT-PCR quantification of gene transcripts.

<u>Gene</u>	<u>Reference</u>
18S rRNA	Hs99999901_s1
FGF21	Mm00840165_g1
PGC-1alpha	Mm447183_m1
UCP1	Mm00494069_m1
Glut1	Mm00441480_m1
PRDM16	Mm00712556_m1
Bmp8b	Mm00432115_g1
CoxIV	Mm00438289_g1
Sirt3	Mm00452129_m1
PPARg	Mm440945_m1
FABP4	Mm00445880_m1
GPR120	Mm00725193_m1
GPR40	Mm00809442_s2
Leptin	Mm00434759_m1
PPIA(cyclophilin)	Mm02342430_g1



5. Discusión

1. Caracterización de la firma molecular de los lipomas asociados al VIH y a su tratamiento

Como ya se ha descrito en la introducción, la terapia HAART contra el virus del VIH-1, así como la propia infección, se asocian con el desarrollo de lipodistrofia, caracterizada por la aparición de numerosos efectos adversos sobre el metabolismo y por el desarrollo de alteraciones morfológicas en los diferentes depósitos de tejido adiposo. Entre estas alteraciones morfológicas se encuentran la lipoatrofia, o pérdida de tejido adiposo subcutáneo en zonas como las extremidades o la cara, y la lipohipertrofia, un crecimiento excesivo que suele aparecer en el depósito visceral (Vigouroux *et al.*, 1999; Villarroya, Domingo and Giralt, 2007). Con menos frecuencia se da la aparición de lipomas, o tumores benignos de tejido adiposo, los cuales pueden aparecer en diferentes partes del cuerpo. Dentro de estos lipomas los más comunes son los que se dan en la zona dorso-cervical, formando una joroba que en la jerga médica suele denominarse como “*buffalo hump*” (giba de búfalo) (Lo *et al.*, 1998). Hasta la fecha no se ha relacionado la aparición de este tipo de lipomas con ningún patrón o combinación de fármacos. Incluso se han reportado casos de “*buffalo hump*” (BH) en pacientes tratados con fármacos nuevos y que habían mostrado no tener apenas efectos tóxicos sobre el tejido adiposo, como es el caso del raltegravir (Ceccarelli *et al.*, 2011) cuyos efectos nulos sobre el tejido adiposo ya se reflejan en esta tesis (Moure *et al.*, 2016).

En un estudio anterior de nuestro grupo se caracterizó como, a diferencia de los depósitos subcutáneos lipoatróficos, el tejido adiposo que conforma los lipomas de tipo BH no presenta signos de inflamación local ni de inhibición de la adipogénesis. Además se observó que en estos lipomas se expresaban genes propios de adipocitos termogénicamente activos (Guallar *et al.*, 2008).

Para ahondar más en la biología de los lipomas de tipo BH, así como para determinar qué los diferencia del resto de lipomas que aparecen en pacientes de VIH-1 tratados con terapia HAART y que han desarrollado lipodistrofia, se puso en marcha un estudio para comparar las firmas moleculares de los lipomas BH,

de los no BH y de depósitos de adiposo subcutáneo provenientes de personas sin lipodistrofia y no infectadas por el virus del VIH-1.

Lo primero que se observó fue como, al igual que lo que ya se había observado en los lipomas BH, los no-BH tampoco presentaban signos de inhibición de la adipogénesis ni de inflamación. Esto parece ir en consonancia con el pensamiento que se ha ido desarrollando a lo largo de los años sobre como la hipertrofia protegería contra la inflamación que tiene lugar en los depósitos subcutáneos lipoatróficos.

En el anterior estudio ya se determinó el carácter lipomatoso de las BHs (Guallar *et al.*, 2008). Es decir, su formación se debe a un proceso de proliferación de las células adiposas (hiperplasia) y no podría ser explicado únicamente por un aumento en la acumulación de lípidos y el consiguiente aumento de tamaño de los adipocitos (hipertrofia). En el actual estudio se demostró que las formaciones no-BH también presentan un carácter lipomatoso.

Cuando los tejidos adiposos sufren una proliferación excesiva, como la que se da en la obesidad mórbida, suelen aparecer procesos de fibrosis en este tejido. La fibrosis se relaciona con el desarrollo de procesos inflamatorios locales como los que aparecen en el tejido adiposo en la obesidad y que pueden desencadenar el desarrollo de resistencia a la insulina (de Luca and Olefsky, 2008; Sun *et al.*, 2013). Sin embargo en el actual estudio se observó que, a pesar de la actividad proliferativa del tejido adiposo de los lipomas BH y no-BH, no hay señales de fibrosis en estas estructuras.

En este estudio se observó también una reducción muy drástica del tamaño de los telómeros de las células tanto de los lipomas BH como de los no-BH. Los telómeros son secuencias de ADN repetidas que se encuentran en los extremos de los cromosomas y cuyo tamaño se reduce con cada división celular. Así, la reducción de estas secuencias es tanto una consecuencia como una causa del envejecimiento de las células. Consecuencia porque su tamaño es inversamente proporcional al número de divisiones que ha sufrido la célula, pero también causa porque la pérdida de material genético situado en los telómeros se considera una

de las causas del envejecimiento (Aubert, 2014). La reducción en los telómeros que se observa en los depósitos BH y no-BH apoya la hipótesis del carácter lipomatoso de estos, ya que indica altas tasas de división celular y por tanto de proliferación, algo que también se ha observado en los depósitos de tejido adiposo hipertrofiado de pacientes obesos (Moreno-Navarrete *et al.*, 2010). Esta relación entre la división celular y la reducción de las secuencias teloméricas es típica de los tumores benignos como los lipomas (Feng, Zhang and Xu, 2013). Por el contrario, en el caso de los tumores malignos la enzima telomerasa se activa y reconstruye los telómeros después de cada división, convirtiendo a las células cancerígenas en inmortales (Chadeneau *et al.*, 1995; Aubert, 2014).

Como ya se ha comentado, la reducción de los telómeros es también un indicador de envejecimiento celular. En estos depósitos se observó también la acumulación de prelamina A, una forma mal procesada y tóxica de la proteína lamina A que se relaciona con procesos de envejecimiento y cuya acumulación también se ha descrito en las áreas lipoatróficas de pacientes con lipodistrofia asociada a la terapia HAART (Coffinier *et al.*, 2007; Caron-Debarle *et al.*, 2010; Béréziat *et al.*, 2011), así como en lipomatosis de origen genético. Esta acumulación de prelamina A, junto a la reducción de los telómeros, indica que tanto en los lipomas BH como los no-BH hay un envejecimiento acelerado y precoz.

Por último, en este estudio se encontró una importante diferencia entre ambos tipos de estructuras lipomatosas. En consonancia con lo observado por nuestro grupo con anterioridad, el tejido adiposo presente en las BHs adquiere características moleculares propias de inducción termogénica (Guallar *et al.*, 2008), ya que en este se observa una sobreexpresión de UCP1 (el gen cuya expresión confiere al tejido adiposo marrón su capacidad de producir calor) así como una represión del gen que codifica el receptor beta-3 adrenérgico (mediador de la señalización termogénica en el tejido adiposo marrón) análoga a la que se da cuando se activa el programa termogénico del tejido adiposo marrón (Bengtsson *et al.*, 1996). Estos marcadores de tejido adiposo marrón no se observan en el resto de depósitos lipomatosos, ni siquiera en aquellos que se encuentran en áreas donde aparecen depósitos de adiposo marrón. No obstante,

se ha observado que este patrón de expresión génica no se asociaría a una producción significativa de calor en el BH, y más bien se trataría de un proceso anómalo de desregulación de la expresión génica asociado al carácter patológico del depósito adiposo BH (Villarroya, Domingo and Giralt, 2009).

Durante los años posteriores al re-descubrimiento del tejido adiposo marrón en humanos adultos y a la descripción del tejido adiposo beige, se ha postulado que este último sería el que conformase los depósitos con capacidad termogénica en los humanos adultos (Sharp *et al.*, 2012). Sin embargo, durante los últimos años se ha descrito la presencia de adipocitos marrones clásicos en los depósitos humanos (Jespersen *et al.*, 2013; Srinivasa *et al.*, 2015). Quisimos estudiar el linaje del tejido adiposo con carácter termogénico presente en los lipomas de tipo BH, y si este era beige o clásico. Para ello se midió la expresión génica de ZIC1, considerado el marcador más fiable de adiposo marrón clásico (Cypess *et al.*, 2013; Jespersen *et al.*, 2013; Lidell *et al.*, 2013; de Jong *et al.*, 2015) y se encontró una sobreexpresión de este gen en los depósitos de tipo BH. Esto indicaría que en la región dorso-cervical de estos pacientes se daría un cambio en la dirección de la adipogénesis (de blanco a marrón) o que sería estimulada con más fuerza la diferenciación de ciertos tipos de poblaciones de células precursoras.

Este estudio tuvo varias limitaciones técnicas y científicas: el número de muestras analizadas no era muy alto debido a la escasez de este tipo de biopsias, no se pudieron estudiar diferentes lipomas provenientes del mismo individuo y se realizó una división entre los lipomas tipo BH y los no-BH, incluyendo en el segundo grupo tejido adiposo de distintas localizaciones, con lo que no se tuvieron en cuenta las posibles diferencias que pudieran aparecer según la región corporal de la que procediesen. Sin embargo, pese a estas limitaciones, este estudio pone de manifiesto cómo tanto la propia infección por el virus VIH-1 como la toxicidad asociada a la terapia HAART pueden producir efectos muy diferentes según la localización del tejido, así como evidenciando la enorme plasticidad del tejido adiposo y la gran diversidad de linajes de adiposo marrón y blanco que conviven en los diferentes depósitos del cuerpo humano.

2. Efectos del nuevo inhibidor de la integrasa viral elvitegravir sobre la diferenciación y la producción de adipoquinas y citoquinas de adipocitos humanos

Una de las principales líneas de investigación del grupo en el que he realizado esta tesis es la búsqueda de las causas de las alteraciones metabólicas y morfológicas producidas por la terapia antirretroviral, tratando de encontrar posibles relaciones entre los distintos fármacos utilizados y alteraciones producidas a nivel molecular y celular en el tejido adiposo.

Normalmente la terapia antirretroviral suele estar compuesta por una combinación de dos fármacos inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de nucleósidos (NRTI) junto a un inhibidor no análogo de nucleósidos (NNRTI) o un inhibidor de la proteasa viral (PI). Estas combinaciones son muy eficaces reduciendo la carga viral y evitando el avance de la enfermedad; sin embargo, como se expuso durante la introducción, pueden llevar a alteraciones metabólicas como resistencia a la insulina y dislipemia (las cuales suponen un incremento en la incidencia de enfermedades cardiovasculares) así como alteraciones en la morfología del tejido adiposo que tienen su mayor exponente en el desarrollo de lipodistrofia (Giralt, Domingo and Villarroya, 2011).

Puesto que estas terapias siempre se basan en la combinación de varios fármacos para evitar el desarrollo de resistencias por parte del virus, es difícil determinar qué fármacos son causantes de las diferentes alteraciones observadas en estos pacientes. Sin embargo, gracias a años de investigación, se ha podido establecer patrones de cómo determinadas familias de fármacos estarían más relacionadas con la incidencia de determinadas dolencias. Por ejemplo, los NRTIs estavudina y zidovudina se han relacionado con el desarrollo de lipoatrofia, mientras que los inhibidores de la proteasa se relacionan con el desarrollo de alteraciones en el metabolismo de la glucosa y con la aparición de resistencia a la insulina (Giralt, Domingo and Villarroya, 2011).

Durante los últimos años ha aparecido una nueva familia de fármacos antirretrovirales: los inhibidores de la integrasa. Como su propio nombre indica, estos fármacos actúan sobre la enzima integrasa que inserta el DNA vírico en el genoma de las células huésped (Blanco *et al.*, 2015). Estos fármacos, entre los que se encuentra el elvitegravir, han demostrado ser muy eficaces en la lucha contra el virus y han demostrado tener pocos efectos secundarios sobre los pacientes. Sin embargo, apenas existe evidencia sobre los posibles efectos de este fármaco sobre el tejido adiposo.

La labor de nuestro grupo no sólo consiste en determinar las causas de las alteraciones observadas en quienes siguen los tratamientos antirretrovirales, sino también en caracterizar los posibles efectos de los nuevos fármacos sobre el tejido adiposo para que los médicos puedan tomarlos en consideración y recomendar seguimientos exhaustivos de los perfiles metabólicos de sus pacientes. Es por esto que decidimos realizar un estudio sobre los efectos del nuevo fármaco elvitegravir sobre adipocitos humanos en cultivo. Este estudio se realizó de forma comparativa, es decir, se estudiaron los efectos de dicho fármaco en comparación con los que producen a dosis equivalentes el efavirenz y el raltegravir.

Se eligió el efavirenz por ser uno de los fármacos más utilizados de la terapia HAART (Gazzard *et al.*, 2008; Hammer *et al.*, 2008), porque se ha estudiado bastante su efecto sobre el metabolismo y el tejido adiposo, tanto in vivo como in vitro, y porque se conoce bastante sobre su farmacocinética y sobre la concentración que alcanza en la sangre de los pacientes, así como sobre cómo se acumula en el tejido adiposo. En estudios clínicos este fármaco ha sido relacionado con la pérdida de tejido adiposo subcutáneo y con alteraciones en los niveles circulantes de triglicéridos y colesterol (Pérez-Molina *et al.*, 2008; Haubrich *et al.*, 2009). Además, en nuestro grupo ya se realizaron dos estudios in vitro, planteados de forma muy similar a este, en los que se estudiaron los efectos de este fármaco sobre adipocitos humanos en cultivo. En estos estudios se observó como el efávirez tiene un potente efecto inhibidor de la adipogénesis e induce la producción de citoquinas proinflamatorias (Gallego-Escuredo *et al.*, 2010; Díaz-Delfín *et al.*, 2011). El tener ya caracterizados los efectos negativos

del efavirenz sobre adipocitos en cultivo convertía a este fármaco en el candidato perfecto para este estudio comparativo. Sin embargo, quisimos comparar también los efectos del elvitegravir con un fármaco de su misma clase, el raltegravir, otro inhibidor de la integrasa y que no ha mostrado no producir efecto alguno sobre los adipocitos en estudios llevados a cabo con cultivos celulares de ratón (Minami *et al.*, 2011; Pérez-Matute *et al.*, 2011).

En este estudio tratamos las células adipocíticas humanas con concentraciones de los fármacos que iban de 0.1 a 5 μ M durante toda la diferenciación. Observamos que el elvitegravir, al igual que el efavirenz, dificulta la adquisición de la morfología típica del adipocito maduro. Además inhibe la expresión de los genes maestros de la adipogénesis PPAR γ y C/EBP α y la de los principales encargados de la acumulación de lípidos GLUT4 y LPL. Además el elvitegravir también reduce la expresión génica y la liberación de adiponectina, que como vimos durante la introducción, tiene un importante papel en la regulación de la homeostasis energética. Estos efectos dañinos fueron muy similares a los que produjo el efavirenz, pero los efectos de este último fueron más intensos.

Sin embargo, la mayor diferencia entre los efectos de ambos fármacos se observó en sus efectos sobre la expresión y liberación de la interleuquina 8 (IL-8). La IL-8 es una citoquina producida y secretada tanto por los adipocitos como por los monocitos y los macrófagos que infiltran el tejido adiposo. Estas células del tejido adiposo la liberan durante la inducción de procesos inflamatorios (Bruun, Pedersen and Richelsen, 2000, 2001). De hecho, la expresión del gen que la codifica se encuentra muy aumentada en el tejido adiposo de pacientes de VIH, sobre todo en el caso de aquellos que han desarrollado lipodistrofia, por lo que probablemente esté contribuyendo al ambiente proinflamatorio que se da en estos tejidos y que puede derivar en el desarrollo de fenómenos de resistencia a la insulina (Lihn *et al.*, 2003). El dato de la IL-8 es de gran importancia, ya que actualmente se considera que muchos de los efectos perniciosos que los fármacos antirretrovirales producen a nivel sistémico podrían deberse a alteraciones en las moléculas reguladoras liberadas por tejido adiposo. En el caso del raltegravir, como ya se había descrito en células de roedor (Pérez-Matute *et al.*, 2011), no se observó ningún efecto sobre la diferenciación ni sobre

la producción de adipoquinas ni citoquinas en los adipocitos humanos usados en nuestro estudio.

Los estudios in vitro conllevan una serie de importantes limitaciones. La primera de ellas se relaciona con las diferencias que podemos encontrar entre las concentraciones de fármacos utilizadas en el estudio y las que realmente se podrían encontrar en el plasma de los pacientes.

En el caso del elvitegravir, los estudios han demostrado que las dosis clínicas de este fármaco llevan a concentraciones mínimas en plasma de aproximadamente 1 uM y máximas de hasta 5µM (Ramanathan *et al.*, 2011), coincidiendo este rango de concentraciones el que ha producido efectos dañinos en nuestro estudio. Sin embargo, el elvitegravir tiene una alta afinidad por las proteínas circulantes. De hecho, la fracción libre en el plasma del elvitegravir (es decir, la proporción del fármaco que circula por el torrente sanguíneo sin unirse a proteínas séricas) es de tan sólo el 1% (Ramanathan *et al.*, 2011). La diferenciación de adipocitos en cultivo requiere del uso de medios sin suero, por lo que probablemente la concentración que el elvitegravir ha alcanzado en nuestros cultivos ha sido mayor que la que se alcanza en el plasma de los pacientes, donde gran parte del fármaco se uniría a proteínas séricas.

La tendencia del efavirenz a unirse a proteínas es muy similar a la del elvitegravir, con una fracción libre en plasma muy baja. Sin embargo el efavirenz se acumula en tejido adiposo, siendo su concentración en los adipocitos de los pacientes mayor que la que se encuentra en el plasma (Dupin *et al.*, 2002). Actualmente no existen referencias sobre la distribución del elvitegravir en los diferentes tejidos ni tampoco sabemos si tiende a acumularse en alguno. Sería muy recomendable realizar estudios de este tipo. Hasta que no se conozcan las concentraciones reales que el elvitegravir alcanza en el tejido adiposo, y teniendo en cuenta los efectos que hemos visto en este estudio, no se puede anticipar que el elvitegravir sea un fármaco “*adipose friendly*”.

Otra limitación de este tipo de estudios está en que las alteraciones sobre el tejido adiposo que aparecen en pacientes tratados con terapia antirretroviral no

se deben al efecto tóxico de un único fármaco. Estos pacientes son tratados con varios fármacos a la vez, que interaccionan entre ellos, pudiendo esta interacción potenciar su propia toxicidad. Además, la propia infección del VIH-1 tiene potencial lipodistrófico, así que habría que añadir sus efectos tóxicos sobre el tejido adiposo a esa compleja red de interacciones entre fármacos.

En resumen, podemos decir que el elvitegravir produce una alteración en la adipogénesis y en la secreción de adipoquinas y citoquinas proinflamatorias que va en aumento con la dosis recibida. Estos efectos son similares a los producidos por el efavirenz, pero menos intensos. Por lo tanto, y puesto que se desconocen las concentraciones que el elvitegravir puede alcanzar sobre el tejido adiposo, cabe recomendar un seguimiento del metabolismo de estos pacientes a lo largo de su tratamiento y la realización de futuros estudios clínicos.

3. Efectos de los fármacos utilizados en la terapia antirretroviral contra la infección por VIH sobre el sistema FGF21/ β -klotho

Las alteraciones en el proceso de diferenciación y la inducción de fenotipos proinflamatorios en el tejido adiposo no son los únicos procesos sospechosos de ser responsables de las alteraciones metabólicas observadas en los pacientes que siguen la terapia antirretroviral. Estudios clínicos en diferentes cohortes de pacientes han reportado un aumento en los niveles de FGF21 circulante en los pacientes infectados por el virus del VIH, el cual es mayor en individuos que siguen la terapia antirretroviral y aun mayor en aquellos que han desarrollado lipodistrofia (Domingo *et al.*, 2010; Gallego-Escuredo *et al.*, 2012).

Esta situación es muy similar a la que se observa en la obesidad y la diabetes tipo II, dolencias ambas que se asocian con un marcado aumento en los niveles circulantes de FGF21, tanto en humanos como en modelos animales (Zhang *et al.*, 2008). Durante los últimos años se ha extendido la teoría que considera la obesidad y la diabetes tipo II como un estado de resistencia a FGF21 (Fisher *et*

al., 2010), y que el aumento de los niveles circulantes de esta hormona en dichas situaciones sería un mecanismo compensatorio similar al que se produce con la leptina y la insulina.

El incremento en los niveles de FGF21 circulante asociado al tratamiento antirretroviral nos hace plantearnos que dicha terapia podría producir también un estado de resistencia a FGF21. De hecho, dos estudios previos de nuestro grupo mostraron cómo tanto en obesos como en pacientes de VIH que siguen la terapia antirretroviral hay una disminución en los niveles de β -klotho (KLB), el correceptor de FGF21, en el tejido adiposo y en el hígado (Gallego-Escuredo *et al.*, 2012, 2015). Además, en otro estudio de nuestro grupo se observó cómo tanto las citoquinas pro-inflamatorias como el estrés de retículo, fenómenos ambos presentes en el tejido adiposo de pacientes obesos y de pacientes que siguen la terapia antirretroviral, producen una caída en los niveles de KLB, que va acompañada de una disminución en la sensibilidad a FGF21 (Díaz-Delfín *et al.*, 2012).

Debido a la gran cantidad de diferentes combinaciones de fármacos utilizada en la terapia antirretroviral a lo largo del tratamiento de los pacientes VIH, no se ha conseguido, hasta la fecha, encontrar una asociación entre los diferentes patrones o combinaciones de fármacos utilizadas con esta desregulación del sistema FGF21/KLB. Es por eso que hemos realizado el primer estudio sistemático para caracterizar los efectos de los principales fármacos de las diferentes familias de antirretrovirales sobre el sistema FGF21/KLB en células procedentes de los órganos y tejidos que guardan una mayor relación con dicho sistema.

En primer lugar se testaron los efectos sobre hepatocitos, ya que el hígado es la principal fuente (y una de las dianas) del FGF21 circulante (Markan *et al.*, 2014). En segundo lugar, se utilizaron adipocitos blancos, ya que se considera que los principales efectos terapéuticos de FGF21 se deben a sus efectos sobre el tejido adiposo (Markan *et al.*, 2014). De hecho, los efectos de FGF21 sobre la captación de glucosa y la oxidación de ácidos grasos en el tejido adiposo son los que han llevado a considerar a FGF21 como una molécula con propiedades

antidiabéticas. Por último, también se estudiaron los efectos de estos fármacos sobre el sistema FGF21 de células musculares. Aunque el músculo esquelético no produce cantidades relevantes de FGF21 (no al menos en condiciones no patológicas) en los últimos años se ha observado como los fenómenos de estrés oxidativo y de disfunción mitocondrial producen un aumento en la expresión y liberación de FGF21 (Suomalainen, 2013; Ribas *et al.*, 2014; Miehle *et al.*, 2016). Además, un estudio reciente ha reportado un aumento en la expresión de *FGF21* en el músculo de pacientes de VIH (Lindegård *et al.*, 2013). Para darle una mayor relevancia clínica a nuestros resultados, en este estudio hemos trabajado con líneas celulares humanas.

Para detectar estos posibles efectos desreguladores sobre el sistema FGF21/KLB y evitar falsos negativos debidos a concentraciones insuficientes, decidimos realizar en primer lugar un *screening* con dosis altas pero no tóxicas de los miembros más importantes de las diferentes familias de antirretrovirales y, seguidamente, realizar experimentos de tipo dosis-respuesta con aquellos fármacos identificados como desreguladores del sistema FGF21/KLB a concentraciones clínicas. Lo primero que observamos fue que en los distintos tipos celulares varios fármacos produjeron alteraciones en el sistema FGF21/KLB análogas a las que se observan en pacientes que siguen el tratamiento antirretroviral. Es decir, se observó un aumento en la expresión de *FGF21* y una disminución en la de *KLB* (Domingo *et al.*, 2010; Gallego-Escuredo *et al.*, 2012; Lindegård *et al.*, 2013).

Los fármacos que produjeron estos efectos fueron el inhibidor de la transcriptasa reversa no análogo de nucleósidos (NNRTI) efavirenz, los diferentes miembros del grupo de los inhibidores de la proteasa viral (PIs) y el inhibidor de la integrasa viral (INSTI) elvitegravir. En estudios anteriores los PIs habían sido relacionados con el desarrollo de alteraciones en la homeostasis de la glucosa (Giralt, Domingo and Villarroya, 2011), lo cual podría guardar una importante relación con esta marcada tendencia a alterar el sistema FGF21/KLB que presentan todos sus miembros. Por su parte, los resultados del INSTI elvitegravir fueron bastante sorprendentes. Como se discutió en el apartado anterior, este fármaco es muy reciente y era considerado como “adipose and metabolic friendly”, sin

embargo, ha resultado ser uno de los fármacos con mayores efectos sobre el sistema FGF21/KLB. Por otra parte, no se detectó ningún efecto sobre el sistema FGF21/KLB por parte de los fármacos inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de nucleótidos (NRTI) estavudina y zidovudina, lo cual es un dato interesante ya que están considerados como los fármacos con mayor potencial lipodistrófico (Giralt, Domingo and Villarroya, 2011).

Durante estos estudios no se encontraron cambios significativos en los niveles de expresión de FGFR1 ni de FGFR4, los receptores de FGF21 en adipocitos y en células hepáticas respectivamente. Sin embargo, los fármacos que producían un aumento en la expresión de *FGF21* inducían a su vez una disminución en la expresión de su co-receptor *KLB* en dichas líneas celulares, siendo expresión de *KLB* indetectable en las células musculares. Al realizar experimentos de dosis-respuesta con los fármacos que habían producido alteraciones sobre el sistema FGF21/KLB durante el *screening* inicial observamos que no solamente aumentaban la expresión de *FGF21* y disminuían la de *KLB* los mismos fármacos, sino que además lo hacían a las mismas concentraciones y presentaban patrones dosis-respuesta inversos. Esto indicaría que el aumento en la expresión de *FGF21* y la disminución de *KLB* podrían estar mediados por los mismos mecanismos moleculares o por las mismas rutas de estrés celular.

Estudios previos han reportado como diferentes miembros de la terapia antirretroviral (incluidos los PIs y el efavirenz) son capaces de activar las rutas de estrés de retículo y de estrés oxidativo (Apostolova *et al.*, 2013; Zha *et al.*, 2013; Borsa *et al.*, 2015). Tanto el estrés oxidativo como el estrés de retículo, fenómenos ambos que también aparecen en el hígado, tejido adiposo y músculo de los pacientes obesos (Cnop, Foufelle and Velloso, 2012; Wang and Kaufman, 2012) son capaces de aumentar la producción de FGF21 en el hígado, en el músculo esquelético y en el tejido adiposo (Schaap *et al.*, 2013; Ribas *et al.*, 2014; Wan *et al.*, 2014). Además, en nuestro grupo se observó como el estrés de retículo es capaz de producir una caída en los niveles de KLB en el tejido adiposo, la cual se asocia a una reducción en la respuesta a los efectos farmacológicos de FGF21 sobre los adipocitos (Díaz-Delfín *et al.*, 2012). Es por eso que procedimos a estudiar el posible papel del estrés oxidativo y el estrés

de retículo en las alteraciones producidas en el sistema FGF21/KLB por los fármacos antirretrovirales. Para ello medimos los niveles de expresión de otros dos genes: por un lado *HSPA5*, una chaperona cuya inducción en los procesos de adaptación a situaciones de alteración de la homeostasis proteica la convierten en un idóneo marcador para detectar procesos de estrés de retículo (Wang and Kaufman, 2012) y, por otro lado, de *CHOP10*, una proteína pro-apoptótica sobreexpresada tanto en el estrés de retículo como en fenómenos de estrés oxidativo (Zinszner *et al.*, 1998; Marciniak *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2008; Kaufman and Malhotra, 2014).

En general, aquellos fármacos que inducían la expresión de *FGF21* y disminuían la de *KLB* en los cultivos de hepatocitos y de adipocitos, también estaban activando las vías de estrés de retículo y de estrés oxidativo. En estudios anteriores ya se había reportado la activación de las rutas de estrés de retículo por parte del efavirenz y del lopinavir/ritonavir en células hepáticas (Apostolova *et al.*, 2013), sin embargo, no se había analizado en adipocitos ni en células musculares. Tampoco se había encontrado hasta la fecha relación entre el elvitegravir y la activación de estas vías. Sin embargo, cabe destacar que en el caso del elvitegravir las alteraciones sobre el sistema FGF21/KLB comenzaban a darse a concentraciones menores que las que llegaban a activar las rutas de estrés de retículo, por lo que consideramos que debe de haber otras rutas mediando en los efectos de este fármaco sobre dichas rutas.

Para comprobar el papel de estas rutas de estrés decidimos realizar estudios con algunos de los fármacos que más alteraban el sistema FGF21/KLB junto a un inhibidor de las vías de estrés de retículo (PBA) y a un antioxidante (TROLOX). Los resultados no fueron demasiado concluyentes, ya que sólo vimos que estos inhibidores disminuían la inducción en la expresión de *FGF21* causada por la combinación lopinavir/ritonavir, pero ni siquiera en ese caso desaparecía la inhibición en la expresión de *KLB*. En un estudio previo de otro grupo se mostraron evidencias de cómo el lopinavir/ritonavir induciría la activación de las rutas de estrés de retículo de forma directa, mientras que en el caso del efavirenz esta vía se induciría como consecuencia de la activación previa de las rutas de estrés oxidativo (Apostolova *et al.*, 2013).

Sin embargo, estos estudios sobre el estrés de retículo, a pesar de haber sido diseñados originariamente para estudiar los efectos de los fármacos de la terapia antirretroviral, nos han dado pistas muy importantes sobre la propia regulación del sistema FGF21/KLB.

Aunque ya había estudios que reportaban la inducción de FGF21 por parte del estrés de retículo (Schaap *et al.*, 2013; Wan *et al.*, 2014) y que esta se llevaba a cabo a nivel de promotor (De Sousa-Coelho, Marrero and Haro, 2012; Ribas *et al.*, 2014), apenas existen estudios sobre la relación entre esta ruta de estrés con el correceptor KLB. En este estudio, si uno observa los resultados obtenidos con los inductores de estrés de retículo tunicamicina y thapsigargina, podrá observar una fuerte y constante inhibición en la expresión de *KLB* tanto en células hepáticas como en adipocitos, la cual desaparece cuando las células se tratan también con el inhibidor del estrés de retículo PBA. Ya había evidencias de que el estrés de retículo disminuía la expresión y los niveles proteicos de KLB (Díaz-Delfín *et al.*, 2012), sin embargo, este estudio nos da pistas sobre cómo esta inhibición puede estar altamente regulada. En primer lugar porque, en el caso de los adipocitos, esta inhibición se da a nivel de la secuencia promotora del gen. En segundo lugar, porque esta disminución en los niveles de transcripción del gen se da de forma casi paralela al aumento de los niveles de FGF21 y de los transcritos relacionados con el estrés de retículo. Que tanto FGF21 como su correceptor KLB vean alterada la expresión de sus genes en dirección opuesta y siguiendo un patrón dosis-respuesta similar pero inverso son un tema muy interesante y que requieren una atención especial.

FGF21 no solamente es inducido por el estrés de retículo, sino que además es capaz de revertir o de moderar algunos de los efectos dañinos de esta situación. Por ejemplo, en estudios *in vivo* en los que se inyectó tunicamicina a ratones, se observó cómo había una disminución de la esteatosis hepática inducida por esta droga cuando la tunicamicina era administrada junto a FGF21 (Jiang *et al.*, 2014). En otro estudio, estas inoculaciones de tunicamicina produjeron efectos más dañinos y mayores inducciones de los genes de estrés de retículo cuando se realizaron en ratones FGF21-KO (Kim *et al.*, 2015). En este mismo estudio se

observó cómo los ratones obesos FGF21-KO presentan niveles más altos de los marcadores de estrés de retículo.

También existen evidencias de como el incremento en la producción de FGF21 ante fenómenos de disfunción mitocondrial tiene un papel protector ante los consiguientes fenómenos de estrés oxidativo. Uno de estos estudios ha sido realizado en nuestro grupo (Planavila *et al.*, 2015). En este estudio se observó cómo FGF21 tiene una función autocrina en los cardiomiocitos, concretamente la de lidiar contra los de fenómenos de estrés oxidativo que asociados al desarrollo de insuficiencia cardiaca, cuando los cardiomiocitos han de llevar a cabo una actividad oxidativa mucho mayor que la habitual para poder mantener el corazón en un estado funcional que permita la supervivencia del individuo. En este contexto, FGF21 promovería la producción de proteínas involucradas en la disipación del estrés oxidativo, entre las que se encontraría la proteína desacoplante UCP2, que contribuiría a disminuir el potencial de la membrana mitocondrial, reduciendo así la formación de especies reactivas de oxígeno.

Estos hechos podrían darnos una pista sobre por qué una proteína como FGF21, que inicialmente era investigada como un regulador de la homeostasis metabólica, se ve cada vez más implicada en fenómenos relacionados con las rutas de estrés y de supervivencia de las células. Como se discutirá en el siguiente apartado de la discusión, existen potentes evidencias sobre el papel autocrino de FGF21 en la inducción del programa termogénico en adipocitos tanto marrones como beige. Durante la activación de la termogénesis se van a producir dos principales fenómenos: por un lado, las catecolaminas inducirán la utilización y degradación de sustratos energéticos, promoviendo un aumento en la actividad oxidativa en las mitocondrias, produciendo por tanto un aumento en el potencial de la membrana interna de éstas. Por otro lado, se inducirá un aumento de los niveles de la proteína desacoplante UCP1, que disminuye el potencial de la membrana mitocondrial interna, disipando parte de este potencial en forma de calor. A la luz de estos hechos, no sería extraño pensar que el papel que FGF21 ostenta en la inducción de la termogénesis adaptativa derivase de un antiguo mecanismo protector frente al estrés oxidativo. Quizás antes de la aparición del papel termorregulador del tejido adiposo marrón FGF21 promoviera

la producción de proteínas desacoplantes como una forma de protección ante el estrés oxidativo similar a lo que sucede con UCP2 con en el corazón. Sería factible que en algún momento de la evolución posterior a la aparición de los mamíferos placentarios esta función derivase en la aparición de un tejido adiposo que, al disipar parte del potencial de la membrana mitocondrial interna, generara calor. Esta nueva fuente de calor llevaría asociada una ventaja evolutiva. De hecho, actualmente se considera que la aparición del tejido adiposo marrón es el evento evolutivo que marca el inicio de la tremenda radiación evolutiva de los mamíferos placentarios, ya que permitió la colonización de latitudes y altitudes más frías, así como la conquista del ambiente nocturno, ambientes más fríos donde no había apenas competencia con los reptiles, que aun ocupaban la mayor parte de los nichos ecológicos terrestres (Oelkrug *et al.*, 2013).

Es por eso que muchos investigadores comienzan a abandonar el concepto de FGF21 como “protector” sino como un miembro activo de ciertas rutas relacionadas con el estrés, como es el caso del estrés de retículo. Las últimas investigaciones indican que FGF21 forma parte de la *Unfolded Protein Response* (UPR) (Li *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015), el conjunto de rutas destinadas a paliar los efectos del estrés de retículo (Wang and Kaufman, 2012). Concretamente FGF21 es inducido por el estrés de retículo gracias a que su secuencia promotora presenta dos lugares de unión a ATF4 (De Sousa-Coelho, Marrero and Haro, 2012). La expresión de ATF4 es inducida durante el estrés de retículo por el factor 2 de iniciación de la traducción (eIF2 α). Esta proteína, cuando es fosforilada por el sensor del estrés de retículo PERK, inhibe la traducción de proteínas (Wang and Kaufman, 2012), disminuyendo así las necesidades de procesamiento de proteínas nuevas y aliviando así los fenómenos de estrés de retículo.

Pero la proteína eIF2 α es mucho más de lo que parece. eIF2 α es el epicentro de la regulación de las respuestas de estrés de las células eucariotas (Pakos-Zebrucka *et al.*, 2016). Como respuesta a diversos estímulos de estrés, las células eucariotas activan una ruta común que tiene como función restablecer la homeostasis celular. Esta vía, o conjunto de vías, se conoce como la *Integrative Stress Response* (ISR) y tiene como evento central la fosforilación de eIF2 α . Esta

fosforilación puede ser llevada a cabo por cuatro miembros de la familia de las quinasas eIF2 α , cuál de ellas lo haga depende del tipo de estrés al que se vea enfrentada la célula. Estas quinasas son la proteína-quinasa dependiente de ARN de doble cadena (PKR), la quinasa del retículo endoplasmático similar a PKR (PERK), la quinasa eIF2 α hemo-regulada (HRI), y la proteína de control general no reprimible 2 (GCN2) (Pakos-Zebrucka *et al.*, 2016).

Cada una de estas quinasas es capaz de poner en marcha *la Integrated Stress Response*, y cada una de ellas es a su vez activada por un estresor distinto. Resulta que los cuatro tipos de estrés que activan estas proteínas son situaciones en las que se conoce que existe una inducción de FGF21: PERK, como ya hemos dicho, es uno de los sensores de estrés de retículo (Wang and Kaufman, 2012); por su parte, GCN2 es activada por situaciones de ayuno y de falta de aminoácidos, una situación en la que se ha descrito la inducción de FGF21 por parte de ATF4 (De Sousa-Coelho, Marrero and Haro, 2012); HRI participa en procesos de estrés oxidativo, en los cuales también se ha descrito la inducción de FGF21 (Ribas *et al.*, 2014; Planavila *et al.*, 2015). PKR, por su parte, supondría uno de los puntos clave al discutir sobre temas relacionados con el VIH. Esta proteína es activada por la presencia de RNAs de doble cadena, una vez activa, fosforilará eIF2 α , el cual inhibirá la traducción de proteínas no sólo celulares, sino también víricas, evitando así que el virus pueda terminar con éxito su ciclo replicativo (Pakos-Zebrucka *et al.*, 2016). Por tanto, la vía RNA de doble cadena - PKR - eIF2 α - ATF4 - FGF21 supondría un nexo entre la infección por el virus del VIH y el aumento de FGF21. En estudios de nuestro grupo se ha visto como los pacientes infectados por el virus del VIH que aún no están recibiendo tratamiento ya presentan un aumento significativo de los niveles circulantes de FGF21 (Domingo *et al.*, 2010; Gallego-Escuredo *et al.*, 2012).

En este contexto de FGF21 como parte de las rutas de respuesta al estrés, sería factible que la bajada de KLB asociada a estos procesos actuase como un *feedback* negativo destinado a regular la respuesta de las células a FGF21, y que por tal motivo la represión de KLB estuviese determinada por los mismos estímulos que promueven la inducción en la producción de FGF21.

Volviendo a los resultados concretos de este estudio, cabe destacar que el encontrar un paralelismo tan grande entre el efecto in vitro de algunos antirretrovirales y los patrones de aumento de FGF21 y disminución de KLB ya observados en pacientes, debería poner sobre aviso de los posibles efectos negativos de estas drogas. Los altos niveles de FGF21 circulante se consideran como un marcador de alteraciones metabólicas tanto en pacientes infectados por VIH (Domingo *et al.*, 2010; Lindegaard *et al.*, 2013; Srinivasa *et al.*, 2015; Miehle *et al.*, 2016) como en no infectados pero que padecen lipodistrofias congénitas, obesidad y/o diabetes tipo II (Zhang *et al.*, 2008; Gallego-Escuredo *et al.*, 2015; Miehle *et al.*, 2016) .

Es muy probable que este aumento de FGF21 circulante que se ve en los pacientes no sea pernicioso de por sí, sino que sea el indicativo de otros procesos de estrés en las células. Es decir, el aumento en los niveles de FGF21 no sería causante de alteraciones en el metabolismo, sino una consecuencia. Sin embargo, los altos niveles de FGF21 circulante sí que se han relacionado con procesos de pérdida de masa y de densidad ósea (Gallego-Escuredo *et al.*, 2017). En este caso FGF21 sí que sería la causa. En estudios realizados en ratones se ha observado cómo tanto los tratamientos crónicos con FGF21, como la sobreexpresión de su gen, son capaces de promover la pérdida de masa ósea (Wei *et al.*, 2012). Este hecho podría ser desencadenado por el efecto inductor que FGF21 tiene sobre PPAR γ , que desviaría la diferenciación de los precursores mesenquimales de médula ósea hacia la adipogénesis, inhibiendo así la osteoblastogénesis (Wei *et al.*, 2012). Otro estudio, que la proteína *insulin-like growth factor binding protein 1* (IGFBP1) tendría un papel clave en la inducción de procesos de osteoclastogénesis producidos por FGF21, ya que FGF21 induce la secreción de IGFBP1 por parte del hígado (Wang *et al.*, 2015).

Este estudio presenta unas limitaciones muy similares a las del anterior trabajo sobre el elvitegravir en su cotejo con los efectos observados de los fármacos in vivo. Las concentraciones que los fármacos alcanzan en el plasma de los pacientes se encuentran en torno a 10 μ M en el caso del lopinavir y del efavirenz y de 5 μ M en el caso del elvitegravir (Pérez-Molina *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2011; Ramanathan *et al.*, 2011). Por tanto, las alteraciones que estos fármacos

produjeron en el sistema FGF21/KLB y en el estrés de retículo en el caso de las células musculares y en los adipocitos fueron producidas en el rango de concentraciones utilizadas en este estudio. Sin embargo, la diferenciación de adipocitos y de células musculares en cultivo requiere la utilización de medios sin FBS o con una concentración muy baja respectivamente. Como se explicó en el apartado anterior, tanto el efavirenz como el elvitegravir presentan una afinidad muy alta por las proteínas plasmáticas (Ramanathan *et al.*, 2011), encontrándose la mayoría de las moléculas de fármaco unidas a las proteínas séricas de los pacientes. Por lo que, probablemente, en nuestros cultivos estas drogas alcanzasen concentraciones más altas que las que se dan en pacientes. Aunque en el caso del efavirenz y del ritonavir existen evidencias de que se produce una acumulación de estos fármacos en el tejido adiposo blanco, lo que podría conllevar que este estuviese realmente expuesto a concentraciones más altas del fármaco (Dupin *et al.*, 2002).

En el caso de los hepatocitos, las alteraciones observadas en el sistema FGF21/KLB y sobre el estrés de retículo tuvieron lugar a dosis muy altas, fuera de los rangos que se darían en la sangre de los pacientes. Sin embargo, estas células se cultivan con suero fetal bovino al 10%, lo que supondría que parte de los fármacos se encontrarían unidos a las proteínas y las concentraciones reales en el medio de cultivo serían más bajas, pudiendo acercarse a las concentraciones de la sangre de los pacientes.

En resumen, podemos afirmar que hemos detectado como algunos de los fármacos más utilizados en la terapia antirretroviral producen alteraciones en el sistema FGF21/KLB. Dichas alteraciones van en la misma dirección que las observadas en pacientes que siguen dicha terapia: una inducción en la expresión del gen que codifica a FGF21 y una disminución en el de su correceptor KLB. Además, las rutas de estrés de retículo y de estrés oxidativo están relacionadas con estos efectos. Teniendo en cuenta cómo los niveles elevados de FGF21 se asocian con alteraciones metabólicas, cardiovasculares y de la regulación de la masa y la densidad ósea, sería interesante una mayor investigación en este campo, tanto a nivel de los efectos de cada fármaco sobre los diferentes tejidos implicados como a nivel de estudios con pacientes.

4. Los niveles de β -klotho determinan la capacidad del tejido adiposo para activar el programa termogénico, fenómeno que se relacionaría con una acción autocrina de FGF21

La presencia del correceptor β -klotho (KLB) se considera absolutamente necesaria para que las células sean sensibles a los efectos farmacológicos de FGF21 (Ding *et al.*, 2012; Owen, Mangelsdorf and Kliewer, 2015). Sin embargo, a pesar de la importancia de este factor y de la conocida disminución de éste en estados asociados a una pérdida en la sensibilidad de los tejidos al efecto de FGF21, no existen hasta la fecha estudios sobre hasta qué punto afectan los niveles de este correceptor a las respuestas mediadas por FGF21 ni sobre si este correceptor podría ser un factor limitante en la señalización de dicha hormona.

Existen estudios de sobreexpresión del gen que codifica al correceptor KLB en el tejido adiposo de ratones. En uno de ellos se pudo observar cómo estos ratones ganaban menos peso cuando eran sometidos a una dieta alta en grasas (HFD) ya que presentaban mayores niveles de oxidación de ácidos grasos (Samms *et al.*, 2016). Esto indicaría que los niveles de KLB sí que determinarían la respuesta de este tejido a FGF21, lo que abriría la puerta al desarrollo de tratamientos que tuvieran la re sensibilización a esta hormona como diana.

Sin embargo, recientemente otro grupo ha publicado un estudio en el que aseguran que la disminución de KLB no es la causante del estado de resistencia a FGF21 del tejido adiposo blanco que se da en la obesidad (Markan *et al.*, 2017). En este estudio se inyectó FGF21 recombinante en ratones obesos que sobreexpresaban el gen *Klb* en el tejido adiposo blanco. A pesar de que estos animales obesos presentaban niveles de KLB similares a los que encontraríamos en un animal sano, su tejido adiposo presentaba signos de resistencia al FGF21 inyectado. Este estudio es criticable por varios motivos. En primer lugar, sólo se estudió el tejido adiposo epididimal y en ningún momento el subcutáneo, considerado como el que realmente determina los efectos beneficiosos de FGF21 sobre el metabolismo. Tampoco se comprobó cómo reaccionarían estos

animales a un aumento de FGF21 producido por el propio tejido adiposo, además no se realizó ninguna observación sobre el posible efecto de FGF21 sobre marcadores termogénicos.

El estudio que he realizado durante esta tesis sobre KLB aporta novedades en su planteamiento que consideramos muy importantes para entender la regulación de la señalización de FGF21. Al contrario que los estudios antes mencionados de sobreexpresión del gen *Klb*, o de otros en los que se elimina el gen por completo, en este estudio se ha recreado un estado de disminución de los niveles de KLB que podría encontrarse de forma natural. Durante la obesidad, la diabetes tipo II y la lipodistrofia asociada al tratamiento antirretroviral los niveles de KLB, tanto en hígado como en el tejido adiposo, disminuyen aproximadamente en un 50%. Nosotros recreamos esta situación mediante el uso de ratones heterocigotos para el gen *Klb*, en los que la expresión génica y los niveles de proteína se reducen a la mitad. Además, en vez de inyectar FGF21 recombinante, decidimos estudiar la respuesta al FGF21 producido por los propios animales ante un estímulo termogénico.

Otra de las novedades de este estudio es el analizar estadísticamente los resultados en busca de posibles relaciones dosis-respuesta. En muchos de nuestros resultados encontramos que los animales heterocigotos para el gen de *Klb* (KLB-HZ) presentaban fenotipos intermedios entre los animales *wild type* (WT) y los *knock-out* (KLB-KO), por lo que decidimos analizar los datos mediante el Test de Pearson, una herramienta estadística que nos sirvió para establecer si tanto la respuesta β -adrenérgica como los niveles de ciertos parámetros en condiciones basales presentaban una relación de dosis-respuesta con respecto a los niveles de KLB. Es decir, consideramos los tres genotipos referidos a KLB como tres dosis génicas diferentes, siendo la de los KLB-KO de 0, la de los WT de 1 y la de los KLB-HZ de $\frac{1}{2}$.

Los animales heterocigotos (KLB-HZ) y los *knock-out* (KLB-KO) se desarrollaron con normalidad, no se encontraron diferencias significativas en su tamaño ni en su peso. Sin embargo, se detectaron diferencias en su adiposidad: los ratones KLB-KO presentaron una masa de tejido adiposo blanco inguinal y epididimal

significativamente mayor (duplicando ésta a la de los animales WT), presentando los KLB-HZ una masa en sus depósitos de adiposo blanco intermedia entre ambos genotipos. Estos resultados eran reforzados por un aumento de los niveles circulantes de leptina tanto en los animales KLB-HZ como KLB-KO. El análisis estadístico mostró que tanto el tamaño de los depósitos de tejido adiposo blanco como los niveles de leptina circulantes aumentaban en una relación lineal inversa a la dosis génica de KLB. Es difícil comparar nuestros resultados con los de otros grupos para encontrar una causa a esta alteración en la adiposidad de los animales. En el único artículo en el que se habla de la adiposidad de los animales KLB-KO, estos son comparados con animales KLB-HZ a modo de control y no con animales WT (Ding *et al.*, 2012). En el caso de estudios con animales FGF21-KO los resultados disponibles en la literatura son contradictorios: mientras que en un estudio se reporta un aumento de la adiposidad (Hotta *et al.*, 2009), en otro se reporta una disminución asociada a la menor actividad de PPAR γ (Dutchak *et al.*, 2012).

Se observó un aumento significativo en los niveles circulantes de FGF21 en los animales KLB-KO. Además, al observar los niveles de expresión génica de FGF21 en el hígado (la principal fuente del FGF21 circulante) vimos cómo ésta aumentó con una relación lineal inversa con respecto a la dosis génica de KLB. El mismo patrón se observó también en los adipocitos blancos y marrones. Estas observaciones sugieren que la disminución de los niveles de KLB es causa suficiente para producir un aumento en la producción de FGF21, apoyando la teoría de que el aumento de los niveles de esta hormona durante situaciones como la obesidad o la lipodistrofia se produciría como respuesta a una situación de resistencia a los efectos de FGF21 causada por una caída en los niveles de su correceptor.

Con respecto a la exposición de los ratones al frío (4°C durante 10 días), los resultados más destacables los observamos en el tejido adiposo subcutáneo inguinal (iWAT). En condiciones de temperatura ambiente (23°C) ya había diferencias en la expresión génica de los principales marcadores de actividad termogénica (*Ucp1*, *Bmp8b* *Cox7a1*), presentando la expresión de estos genes una relación lineal con respecto a la dosis génica de KLB. Este hecho indicaría

que el mero hecho de poseer menos KLB llevaría a la presencia de menos adipocitos pluriloculares con capacidad termogénica en el iWAT. Pero además, al exponer a estos animales al frío durante 10 días observamos fuertes diferencias en el desarrollo del proceso de *browning* de este tejido entre los diferentes genotipos. La relación lineal entre los niveles de expresión de los marcadores termogénicos y la dosis génica de KLB no sólo se mantenía, sino que era mucho más acusada, con una recta de regresión significativamente muy diferente a la que observábamos a temperatura ambiente, indicando que la disminución de KLB produce una disminución en la respuesta a estímulos β -adrenérgicos. En el caso de los niveles de la proteína UCP1 los resultados fueron muy similares.

Estos resultados apoyan los estudios de Fisher, que demostraron que FGF21 es necesario para la activación del programa termogénico del tejido adiposo marrón y para inducción del *browning* del tejido adiposo blanco ante una exposición al frío (Fisher *et al.*, 2012). En dicho estudio, puesto que ante el frío no se observó un gran aumento en los niveles de FGF21 circulante, se postuló que el papel de FGF21 en estos procesos sería llevado a cabo de forma autocrina. Sin embargo, se existen estudios que sugieren que el FGF21 producido por el tejido adiposo ante un estímulo β -adrenérgico podría unirse al *pool* de FGF21 circulante y activar el programa termogénico por vías endocrinas (Hondares *et al.*, 2011). De hecho, en un estudio reciente realizado con animales KO para el gen *Klb* únicamente a nivel cerebral, se ha observado cómo FGF21 actúa sobre el hipotálamo, dando lugar a una estimulación del sistema nervioso simpático sobre el tejido adiposo marrón (Owen *et al.*, 2014). Los ratones KLB-HZ y KLB-KO utilizados en mi estudio no eran específicos de tejido, por lo que esta disminución en los niveles de KLB se produciría también a nivel del sistema nervioso central (SNC). No se puede descartar que esta disminución de los niveles de KLB a nivel del SNC tenga que ver con las alteraciones observadas en el *browning* del iWAT.

Para determinar si la deficiencia en la respuesta termogénica asociada a la disminución de los niveles de KLB podía deberse a un fenómeno autónomo de la célula derivado de un papel autocrino de FGF21 en la respuesta a estímulos β -adrenérgicos, decidimos tratar de replicar estos resultados con cultivos

primarios de adipocitos blancos procedentes de ratones WT, HZ y KO para KLB tratados con un agonista específico del receptor β -3-adrenérgico. En estos cultivos no se observaron diferencias entre los niveles de diferenciación adipocitaria asociadas a los distintos genotipos. Además, al igual que en el estudio *in vivo*, los niveles de expresión de *Klb* en las células procedentes de animales heterocigotos eran de aproximadamente la mitad que en los controles.

En esta aproximación *in vitro*, al contrario de lo que pasaba *in vivo*, no se observaron diferencias entre los niveles basales de expresión de *Ucp1*. Sin embargo, cuando los adipocitos eran tratados con el agonista β -3 adrenérgico, la relación lineal entre la dosis génica de KLB y los niveles de transcripción *Ucp1* era mucho más marcada que en el estudio realizado *in vivo*. Estos resultados apoyarían nuestra hipótesis de que esta falta de respuesta termogénica asociada a la disminución de KLB tendría una naturaleza autónoma de la célula debida a una acción autocrina de FGF21. Si bien, estos resultados no excluyen que FGF21 estimule la respuesta termogénica también a través del sistema nervioso central. Ambos modelos son absolutamente compatibles e incluso complementarios. La selección natural podría haber fijado ambos mecanismos como forma de reafirmar la lucha contra la hipotermia. Los mecanismos fisiológicos redundantes son habituales cuando se encargan de mediar en situaciones que pueden ser de vida o muerte para los individuos.

Se realizó el mismo experimento con cultivos primarios de adipocitos marrones con los mismos tres genotipos para KLB y tratados con el mismo agonista β -3-adrenérgico. En este caso los resultados no fueron tan claros como en el caso de los adipocitos blancos, ya que, aunque se observa una marcada disminución del aumento de *Ucp1* en las células KLB-KO, no se observa una respuesta intermedia para las KLB-HZ. Es decir, no se mantiene la relación lineal entre la dosis de KLB y la respuesta termogénica. Esto podría deberse a que el aumento tanto en la expresión como en la liberación al medio de FGF21 durante el tratamiento es la misma en las células WT y en la KLB-HZ, sin embargo, los marcadores de la respuesta a FGF21 *Glut1* y *Egr1* sí que presentan una menor inducción en las células KLB-HZ durante el tratamiento, demostrando una disminución en la sensibilidad a FGF21.

Cabe destacar que en el caso de los adipocitos blancos la delección total del gen *Klb* llevaba a una pérdida absoluta de la inducción de la expresión génica de las dianas directas de FGF21 (*Glut1* y *Egr1*). En el caso de los adipocitos marrones, aunque hay una disminución de la inducción, esta no se pierde del todo. Este hecho podría indicar algún tipo de mecanismo de señalización de FGF21 independiente de KLB en los adipocitos marrones. Esta hipótesis parece atrevida si tenemos en cuenta los estudios que han demostrado como KLB es un correceptor obligatorio de FGF21, sin embargo, estos estudios se realizaron inyectando FGF21 recombinante (Adams *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2012) o sobreexpresando FGF21 en el hígado de los animales (Ding *et al.*, 2012), nunca se realizaron analizando los efectos de un aumento de FGF21 producido por el cuerpo del propio individuo en condiciones fisiológicas o en tejidos cuyas células fueran diana del FGF21 producido por ellas mismas. Por tanto, no podemos descartar que en los adipocitos marrones FGF21 pueda desencadenar algún tipo de respuesta independiente de KLB, ya sea actuando a nivel intracelular o mediante otra vía que aún no conocemos.

De hecho, durante esta tesis he realizado también experimentos con cultivos primarios de adipocitos blancos y marrones procedentes de estos tres genotipos para KLB (WT, KLB-HZ y KLB-KO) tratados con un agonista del receptor de ácidos grasos libres GPR120. Un estudio realizado en nuestro grupo, del que soy coautor y que puede consultarse en esta tesis (Quesada-López *et al.*, 2016) demuestra como la activación del receptor GPR120 produce la activación del programa termogénico, tanto en adipocitos blancos como marrones, de un modo dependiente una acción autocrina de FGF21. En este estudio observamos cómo la activación termogénica de los adipocitos tratados con agonistas de GPR120 desaparecía cuando los adipocitos procedían de animales KO para FGF21. Al realizar el mismo experimento pero con células KLB-HZ y KLB-KO los resultados fueron sorprendentes. En el caso de los adipocitos blancos, la falta de KLB llevaba a una disminución de la activación termogénica y a una bajada de la inducción de los marcadores de respuesta a FGF21 *Glut1* y *Egr1*. Sin embargo, en el caso de los adipocitos marrones, la inducción de los genes termogénicos y la de las dianas de FGF21 no se veía alterada, ni siquiera en las células procedentes de animales KLB-KO. Este experimento apoyaría la hipótesis de

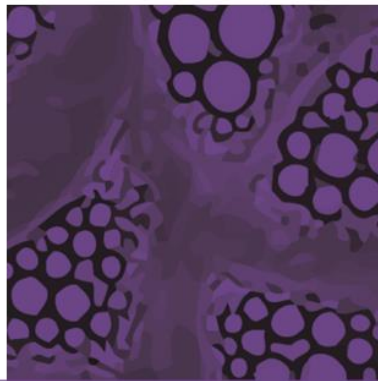
una posible vía de señalización de FGF21 independiente de KLB, y que ésta existiría en los adipocitos marrones pero no en los blancos. En un artículo reciente se demostró que gamma klotho, una proteína de la familia klotho, sería capaz de interactuar con los receptores FGFR y actuar como correceptor de FGF19/15 y, en menor medida, de FGF21 (Fon Tacer *et al.*, 2010). Además en este mismo estudio se observó que el tejido adiposo marrón es, junto al ojo, el único tejido donde gamma klotho presenta niveles altos de expresión (Fon Tacer *et al.*, 2010). Por tanto, la posible señalización de FGF21 a través de gamma klotho en el tejido adiposo marrón sería un tema de estudio muy interesante.

Para comprobar si esta disminución en la respuesta termogénica asociada a la disminución de KLB era debida a una pérdida en una acción autocrina por parte de FGF21, decidimos realizar también estudios con cultivos primarios de adipocitos blancos y de marrones procedentes de animales FGF21-KO. No se observaron diferencias en los niveles de diferenciación asociadas al genotipo. Al tratar las células con el agonista β -3 adrenérgico observamos que la respuesta termogénica de las células FGF21-KO (tanto marrones como blancas) era mucho menor, lo que añade más pruebas a la hipótesis del papel autocrino de FGF21 en la activación del programa termogénico.

Volviendo con los resultados de este artículo, es remarcable como apenas hay diferencias entre los tres genotipos de KLB (WT, KLB-HZ y KLB-KO) en la expresión génica de los diferentes genes relacionados con la termogénesis en el tejido adiposo marrón (BAT) de los animales expuestos al frío. Tampoco se observaron diferencias morfológicas al realizar los análisis histológicos. Las únicas diferencias remarcables se observaron en los niveles de la proteína UCP1, ya que sólo se detectó un aumento significativo producido por el frío en el BAT de los animales WT. Sobre este resultado tan diferente entre el BAT y el iWAT de los animales expuestos al frío, cabe destacar (además de lo ya explicado al hablar sobre los cultivos primarios) un artículo publicado muy recientemente utilizando animales KLB-KO. En este estudio se observó cómo los animales KLB-KO estaban protegidos de la obesidad inducida por una dieta alta en grasas debido a la activación del adiposo marrón (Somm *et al.*, 2017). Esta sorprendente activación del BAT en los animales KLB-KO se debía a un aumento

en la producción de ácidos biliares y a un cambio en la composición de éstos, que producía un cambio en la microbiota intestinal. Esta nueva microbiota metabolizaba mayores cantidades del ácido cólico producido por el hígado en ácido deoxicólico, el cual era liberado al torrente sanguíneo y era capaz de activar el BAT a través del receptor TGR5. Todo ello también podría implicar a FGF19/15 y su señalización desde el intestino al hígado donde, de forma dependiente de la unión con KLB, controla la homeostasis de los ácidos biliares. Las escasas alteraciones en el tejido adiposo marrón ante la disminución de KLB que observamos en mi estudio podrían estar relacionadas con lo descrito por Somm et al.

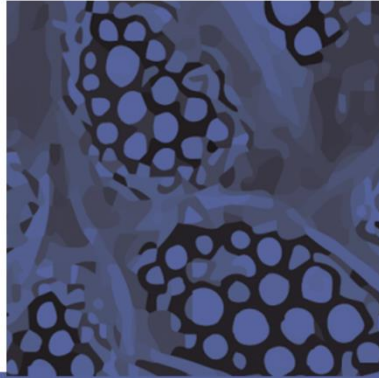
En resumen, podemos decir que los niveles de KLB determinan la capacidad del tejido adiposo de responder a los efectos de FGF21. Entre estos efectos, cabría destacar la capacidad de activación del programa termogénico, debido a un papel autocrino de FGF21 en la respuesta a estímulos β -adrenérgicos.



6. Conclusiones

- 1.** Los lipomas que aparecen en la lipodistrofia asociada a la infección por VIH y al tratamiento antirretroviral, independientemente de su localización, no presentan signos de alteraciones en la adipogénesis, procesos inflamatorios ni disfunción mitocondrial, aunque sí de encontrarse en un estado de alta proliferación celular y de envejecimiento precoz.
- 2.** Los lipomas de tipo “giba de búfalo” son los únicos que presentan unos patrones de expresión génica relacionados con el linaje celular de los adipocitos marrones clásicos.
- 3.** El nuevo fármaco antirretroviral inhibidor de la integrasa vírica elvitegravir, en contraste con el raltegravir, produce alteraciones en la diferenciación de cultivos de adipocitos humanos, así como alteraciones en la expresión y secreción de adipoquinas y de citoquinas proinflamatorias. No obstante, las alteraciones tienden a ser de menor magnitud que las producidas por el inhibidor de la transcriptasa reversa no análogo de nucleósido efavirenz.
- 4.** La mayoría de fármacos antirretrovirales inhibidores de la proteasa vírica, el inhibidor de la transcriptasa reversa no análogo de nucleósidos efavirenz y el inhibidor de la integrasa elvitegravir, inducen la expresión de FGF21 y disminuyen la de β -klotho en cultivos de células hepáticas, adiposas y musculares humanas.
- 5.** Los fármacos antirretrovirales que alteran la expresión de FGF21 y de β -Klotho son los mismos que activan las rutas de estrés de retículo endoplasmático y de estrés oxidativo.

6. En el ratón, la delección parcial o total de β -Klotho produce un incremento en la adiposidad, un aumento en la expresión de FGF21 en el hígado y en los tejidos adiposos y una elevación de los niveles circulantes de dicha hormona.
7. La disminución en los niveles de β -Klotho en ratones produce una leve reducción en la respuesta del tejido adiposo marrón al frío y una pérdida potente en la capacidad de *browning* del tejido adiposo blanco.
8. Los niveles de β -klotho determinan la capacidad de los adipocitos marrones y beige para responder a un estímulo beta-adrenérgico. La deficiencia en FGF21 mimetiza ese efecto, sugiriendo la implicación autocrina de FGF21 en la repuesta termogénica de los adipocitos.



7. Bibliografía

- A**dams, A. C., Cheng, C. C., Coskun, T. and Kharitononkov, A. (2012) 'FGF21 Requires β klotho to Act In Vivo', *PLoS ONE*, 7(11). doi: 10.1371/journal.pone.0049977.
- Ahima, R. S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E. and Flier, J. S. (1996) 'Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting', *Nature*, 382(6588), pp. 250–252. doi: 10.1038/382250a0.
- Altarejos, J. Y. and Montminy, M. (2011) 'CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals.', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(3), pp. 141–51. doi: 10.1038/nrm3072.
- Apostolova, N., Gomez-Sucerquia, L. J., Alegre, F., Funes, H. A., Victor, V. M., Barrachina, M. D., Blas-Garcia, A. and Esplugues, J. V. (2013) 'ER stress in human hepatic cells treated with Efavirenz: Mitochondria again', *Journal of Hepatology*, 59(4), pp. 780–789. doi: 10.1016/j.jhep.2013.06.005.
- Arner, P., Pettersson, A., Mitchell, P. J., Dunbar, J. D., Kharitononkov, A. and Rydén, M. (2008) 'FGF21 attenuates lipolysis in human adipocytes - A possible link to improved insulin sensitivity', *FEBS Letters*, 582(12), pp. 1725–1730. doi: 10.1016/j.febslet.2008.04.038.
- Aubert, G. (2014) 'Telomere dynamics and aging', *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 125, pp. 89–111. doi: 10.1016/B978-0-12-397898-1.00004-9.
- B**adman, M. K., Pissios, P., Kennedy, A. R., Koukos, G., Flier, J. S. and Maratos-Flier, E. (2007) 'Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPAR α and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States', *Cell Metabolism*, 5(6), pp. 426–437. doi: 10.1016/j.cmet.2007.05.002.
- Banerjee, R. R. (2004) 'Regulation of Fasted Blood Glucose by Resistin', *Science*, 303(5661), pp. 1195–1198. doi: 10.1126/science.1092341.
- Barbatelli, G., Morroni, M., Vinesi, P., Cinti, S. and Michetti, F. (1993) 'S-100

- Protein in Rat Brown Adipose Tissue under Different Functional Conditions: A Morphological, Immunocytochemical, and Immunochemical Study', *Experimental Cell Research*, 208(1), pp. 226–231. doi: 10.1006/excr.1993.1241.
- Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K., Giacobino, J. P., De Matteis, R. and Cinti, S. (2010) 'The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation', *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 298(6), pp. E1244–E1253. doi: 10.1152/ajpendo.00600.2009.
- Barbera, M. J., Schluter, A., Pedraza, N., Iglesias, R., Villarroya, F. and Giral, M. (2001) 'Peroxisome Proliferator-activated Receptor Activates Transcription of the Brown Fat Uncoupling Protein-1 Gene: A LINK BETWEEN REGULATION OF THE THERMOGENIC AND LIPID OXIDATION PATHWAYS IN THE BROWN FAT CELL', *Journal of Biological Chemistry*, 276(2), pp. 1486–1493. doi: 10.1074/jbc.M006246200.
- Bartelt, A. and Heeren, J. (2014) 'Adipose tissue browning and metabolic health.', *Nature reviews. Endocrinology*, 10(1), pp. 24–36. doi: 10.1038/nrendo.2013.204.
- Beenken, A. and Mohammadi, M. (2009) 'The FGF family: biology, pathophysiology and therapy.', *Nature reviews. Drug discovery*, 8(3), pp. 235–53. doi: 10.1038/nrd2792.
- Bengtsson, T., Redegren, K., Strosberg, A. D., Nedergaard, J. and Cannon, B. (1996) 'Down-regulation of β 3 adrenoreceptor gene expression in brown fat cells is transient and recovery is dependent upon a short-lived protein factor', *Journal of Biological Chemistry*, 271(52), pp. 33366–33375. doi: 10.1074/jbc.271.52.33366.
- Béréziat, V., Cervera, P., Le Dour, C., Verpont, M. C., Dumont, S., Vantyghem, M. C., Capeau, J. and Vigouroux, C. (2011) 'LMNA mutations induce a

non-inflammatory fibrosis and a brown fat-like dystrophy of enlarged cervical adipose tissue', *American Journal of Pathology*, 179(5), pp. 2443–2453. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.07.049.

Berglund, E. D., Li, C. Y., Bina, H. A., Lynes, S. G., Michael, M. D., Shanafelt, A. B., Kharitononkov, A. and Wasserman, D. H. (2009) 'Fibroblast growth factor 21 (FGF21) controls glycemia via regulation of hepatic glucose flux and insulin sensitivity', *Endocrinology*, 150(9), pp. 4084–4093. doi: 10.1210/en.2009-0221.

Berthoud, H.-R. (2012) 'The neurobiology of food intake in an obesogenic environment', *Proceedings of the Nutrition Society*, 71(4), pp. 478–487. doi: 10.1017/S0029665112000602.

Blanco, J. L., Whitlock, G., Milinkovic, A. and Moyle, G. (2015) 'HIV integrase inhibitors: a new era in the treatment of HIV', *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 16(9), pp. 1313–1324. doi: 10.1517/14656566.2015.1044436.

Borsa, M., Ferreira, P. L. C., Petry, A., Ferreira, L. G. E., Camargo, M. M., Bou-Habib, D. C. and Pinto, A. R. (2015) 'HIV infection and antiretroviral therapy lead to unfolded protein response activation.', *Virology journal*, 12, p. 77. doi: 10.1186/s12985-015-0298-0.

Boyd, M. A., Carr, A., Ruxrungtham, K., Srasuebkul, P., Bien, D., Law, M., Wangsuphachart, S., Krisanachinda, A., Lerdlum, S., Lange, J. M. A., Phanuphak, P., Cooper, D. A. and Reiss, P. (2006) 'Changes in Body Composition and Mitochondrial Nucleic Acid Content in Patients Switched from Failed Nucleoside Analogue Therapy to Ritonavir-Boosted Indinavir and Efavirenz', *The Journal of Infectious Diseases*, 194(5), pp. 642–650. doi: 10.1086/505709.

Brasaemle, D. L. (2007) 'Thematic review series: Adipocyte Biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis', *The Journal of Lipid Research*, 48(12), pp. 2547–2559. doi: 10.1194/jlr.R700014-JLR200.

Bruun, J. M., Pedersen, S. B. and Richelsen, B. (2001) 'Regulation of interleukin 8 production and gene expression in human adipose tissue in vitro.', *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 86(3), pp. 1267–73. doi: 10.1210/jcem.86.3.7264.

Bruun, J., Pedersen, S. and Richelsen, B. (2000) 'Interleukin-8 Production in Human Adipose Tissue. Inhibitory Effects of Anti-Diabetic Compounds, the Thiazolidinedione Ciglitazone and the Biguanide Metformin', *Hormone and Metabolic Research*, 32(11/12), pp. 537–541. doi: 10.1055/s-2007-978682.

Cannon, B. and Nedergaard, J. (2004) 'Brown adipose tissue: function and physiological significance.', *Physiological reviews*, 84(1), pp. 277–359. doi: 10.1152/physrev.00015.2003.

Cannon, B. and Nedergaard, J. (2011) 'Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies', *Journal of Experimental Biology*, 214(2), pp. 242–253. doi: 10.1242/jeb.050989.

Cao, W., Daniel, K. W., Robidoux, J., Puigserver, P., Medvedev, A. V, Bai, X., Floering, L. M., Spiegelman, B. M. and Collins, S. (2004) 'p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene.', *Molecular and cellular biology*, 24(7), pp. 3057–67. doi: 10.1128/MCB.24.7.3057.

Cao, W., Medvedev, A. V., Daniel, K. W. and Collins, S. (2001) '??-adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 map kinase', *Journal of Biological Chemistry*, 276(29), pp. 27077–27082. doi: 10.1074/jbc.M101049200.

Carmen Carmona, M., Iglesias, R., Obregón, M. J., Darlington, G. J. and Villarroya, F. (2002) 'Mitochondrial biogenesis and thyroid status maturation in brown fat require CCAAT/enhancer-binding protein α ', *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), pp. 21489–21498. doi: 10.1074/jbc.M201710200.

- Caron-Debarle, M., Lagathu, C., Boccara, F., Vigouroux, C. and Capeau, J. (2010) 'HIV-associated lipodystrophy: from fat injury to premature aging', *Trends in Molecular Medicine*, pp. 218–229. doi: 10.1016/j.molmed.2010.03.002.
- Caron, M., Auclair, M., Lagathu, C., Lombès, A., Walker, U. a, Kornprobst, M. and Capeau, J. (2004) 'The HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors stavudine and zidovudine alter adipocyte functions in vitro.', *AIDS (London, England)*, 18(16), pp. 2127–2136. doi: 10.1097/00002030-200411050-00004.
- Carr, A., Samaras, K., Burton, S., Law, M., Freund, J., Chisholm, D. J. and Cooper, D. A. (1998) 'A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors', *AIDS*, 12(7), pp. F51–F58. doi: 10.1097/00002030-199807000-00003.
- Ceccarelli, G., d'Ettorre, G., Marchetti, F., Rizza, C., Mastroianni, C. M., Carlesimo, B. and Vullo, V. (2011) 'Development of Buffalo Hump in the course of antiretroviral therapy including raltegravir and unboosted atazanavir: a case report and review of the literature', *Journal of Medical Case Reports*, 5(1), p. 70. doi: 10.1186/1752-1947-5-70.
- Chadeneau, C., Hay, K., Hirte, H. W., Gallinger, S. and Bacchetti, S. (1995) 'Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer.', *Cancer research*, 55(12), pp. 2533–6.
- Chan, J. L., Heist, K., DePaoli, A. M., Veldhuis, J. D. and Mantzoros, C. S. (2003) 'The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men', *Journal of Clinical Investigation*, 111(9), pp. 1409–1421. doi: 10.1172/JCI200317490.
- Chen, W.-W., Li, L., Yang, G.-Y., Li, K., Qi, X.-Y., Zhu, W., Tang, Y., Liu, H. and Boden, G. (2008) 'Circulating FGF-21 levels in normal subjects and in newly diagnose patients with Type 2 diabetes mellitus.', *Experimental and clinical endocrinology & diabetes: official journal, German Society of*

Endocrinology [and] German Diabetes Association, 116(1), pp. 65–8. doi: 10.1055/s-2007-985148.

Chen, W., Hoo, R. L. C., Konishi, M., Itoh, N., Lee, P. C., Ye, H. Y., Lam, K. S. L. and Xu, A. (2011) 'Growth hormone induces hepatic production of fibroblast growth factor 21 through a mechanism dependent on lipolysis in adipocytes', *Journal of Biological Chemistry*, 286(40), pp. 34559–34566. doi: 10.1074/jbc.M111.285965.

Cinti, S. (2005) 'The adipose organ', in *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, pp. 9–15. doi: 10.1016/j.plefa.2005.04.010.

Cnop, M., Foufelle, F. and Velloso, L. A. (2012) 'Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes', *Trends in Molecular Medicine*, pp. 59–68. doi: 10.1016/j.molmed.2011.07.010.

Coffinier, C., Hudon, S. E., Farber, E. A., Chang, S. Y., Hrycyna, C. A., Young, S. G. and Fong, L. G. (2007) 'HIV protease inhibitors block the zinc metalloproteinase ZMPSTE24 and lead to an accumulation of prelamin A in cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104(33), pp. 13432–7. doi: 10.1073/pnas.0704212104.

Cristancho, A. G. and Lazar, M. A. (2011) 'Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(11), pp. 722–734. doi: 10.1038/nrm3198.

Cuevas-Ramos, D., Aguilar-Salinas, C. a. and Gómez-Pérez, F. J. (2012) 'Metabolic actions of fibroblast growth factor 21', *Current Opinion in Pediatrics*, 24(4), pp. 523–529. doi: 10.1097/MOP.0b013e3283557d22.

Cypess, A. M., White, A. P., Vernochet, C., Schulz, T. J., Xue, R., Sass, C. A., Huang, T. L., Roberts-Toler, C., Weiner, L. S., Sze, C., Chacko, A. T., Deschamps, L. N., Herder, L. M., Truchan, N., Glasgow, A. L., Holman, A. R., Gavrilu, A., Hasselgren, P.-O., Mori, M. A., Molla, M. and Tseng, Y.-H. (2013) 'Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat', *Nature Medicine*, 19(5), pp. 635–639. doi: 10.1038/nm.3112.

- Díaz-Delfín, J., Domingo, P., Mateo, M. G., Gutierrez, M. D. M., Domingo, J. C., Giralt, M. and Villarroya, F. (2012) 'Effects of rilpivirine on human adipocyte differentiation, gene expression, and release of adipokines and cytokines', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(6), pp. 3369–3375. doi: 10.1128/AAC.00104-12.
- Díaz-Delfín, J., Domingo, P., Wabitsch, M., Giralt, M. and Villarroya, F. (2012) 'HIV-1 Tat protein impairs adipogenesis and induces the expression and secretion of proinflammatory cytokines in human SGBS adipocytes', *Antiviral Therapy*, 17(3), pp. 529–540. doi: 10.3851/IMP2021.
- Díaz-Delfín, J., Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, M., Caelles, C. and Villarroya, F. (2012) 'TNF- α represses β -klotho expression and impairs FGF21 action in adipose cells: Involvement of JNK1 in the FGF21 pathway', *Endocrinology*, 153(9), pp. 4238–4245. doi: 10.1210/en.2012-1193.
- Díaz-Delfín, J., del Mar Gutiérrez, M., Gallego-Escuredo, J. M., Domingo, J. C., Gracia Mateo, M., Villarroya, F., Domingo, P. and Giralt, M. (2011) 'Effects of nevirapine and efavirenz on human adipocyte differentiation, gene expression, and release of adipokines and cytokines', *Antiviral Research*, 91(2), pp. 112–119. doi: 10.1016/j.antiviral.2011.04.018.
- Ding, X., Boney-Montoya, J., Owen, B. M., Bookout, A. L., Coate, K. C., Mangelsdorf, D. J. and Kliewer, S. A. (2012) ' β Klotho Is Required for Fibroblast Growth Factor 21 Effects on Growth and Metabolism', *Cell metabolism*, 16(3), pp. 387–393. doi: 10.1016/j.cmet.2012.08.002.
- Domingo, P., Gallego-Escuredo, J. M., Domingo, J. C., Gutiérrez, M. del M., Mateo, M. G., Fernández, I., Vidal, F., Giralt, M. and Villarroya, F. (2010) 'Serum FGF21 levels are elevated in association with lipodystrophy, insulin resistance and biomarkers of liver injury in HIV-1-infected patients', *AIDS*, 24(17), pp. 2629–2637. doi: 10.1097/QAD.0b013e3283400088.
- Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R. N. and Montminy, M. (2003) 'TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver.', *Science (New York, N.Y.)*, 300(2003), pp. 1574–1577. doi: 10.1126/science.1079817.

- Dupin, N., Buffet, M., Marcelin, A.-G., Lamotte, C., Gorin, I., Ait-Arkoub, Z., Tréluyer, J.-M., Bui, P., Calvez, V. and Peytavin, G. (2002) 'HIV and antiretroviral drug distribution in plasma and fat tissue of HIV-infected patients with lipodystrophy.', *AIDS (London, England)*, 16(18), pp. 2419–2424.
- Dushay, J., Chui, P. C., Gopalakrishnan, G. S., Varela-Rey, M., Crawley, M., Fisher, F. M., Badman, M. K., Martinez-Chantar, M. L. and Maratos-Flier, E. (2010) 'Increased fibroblast growth factor 21 in obesity and nonalcoholic fatty liver disease', *Gastroenterology*, 139(2), pp. 456–463. doi: 10.1053/j.gastro.2010.04.054.
- Dutchak, P. A., Katafuchi, T., Bookout, A. L., Choi, J. H., Yu, R. T., Mangelsdorf, D. J. and Kliewer, S. A. (2012) 'Fibroblast growth factor-21 regulates PPARG activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones', *Cell*, 148(3), pp. 556–567. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.062.
- F**azeli, P. K., Lun, M., Kim, S. M., Bredella, M. A., Wright, S., Zhang, Y., Lee, H., Catana, C., Klibanski, A., Patwari, P. and Steinhauser, M. L. (2015) 'FGF21 and the late adaptive response to starvation in humans', *Journal of Clinical Investigation*, 125(12), pp. 4601–4611. doi: 10.1172/JCI83349.
- Feldmann, H. M., Golozoubova, V., Cannon, B. and Nedergaard, J. (2009) 'UCP1 Ablation Induces Obesity and Abolishes Diet-Induced Thermogenesis in Mice Exempt from Thermal Stress by Living at Thermoneutrality', *Cell Metabolism*, 9(2), pp. 203–209. doi: 10.1016/j.cmet.2008.12.014.
- Feng, B., Zhang, T. and Xu, H. (2013) 'Human adipose dynamics and metabolic health', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1281(1), pp. 160–177. doi: 10.1111/nyas.12009.
- Ferrer, E., Rio, L. Del, Martínez, E., Curto, J., Domingo, P., Ribera, E., Negro, E., Rosales, J., Saumoy, M., Ordóñez, J., Gatell, J. M. and Podzamczak, D. (2011) 'Impact of Switching from Lopinavir/Ritonavir to Atazanavir/Ritonavir on Body Fat Redistribution in Virologically Suppressed HIV-Infected Adults', *AIDS Research and Human*

Retroviruses, 27(10), pp. 1061–1065. doi: 10.1089/AID.2010.0254.

Fisher, F. F., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E. C., Mepani, R. J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonov, A., Flier, J. S., Maratos-Flier, E. and Spiegelman, B. M. (2012) 'FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis', *Genes and Development*, 26(3), pp. 271–281. doi: 10.1101/gad.177857.111.

Fisher, F. M., Chui, P. C., Antonellis, P. J., Bina, H. A., Kharitonov, A., Flier, J. S. and Maratos-Flier, E. (2010) 'Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state', *Diabetes*, 59(11), pp. 2781–2789. doi: 10.2337/db10-0193.

Fisher, F. M., Estall, J. L., Adams, A. C., Antonellis, P. J., Bina, H. A., Flier, J. S., Kharitonov, A., Spiegelman, B. M. and Maratos-Flier, E. (2011) 'Integrated regulation of hepatic metabolism by fibroblast growth factor 21 (FGF21) in vivo', *Endocrinology*, 152(8), pp. 2996–3004. doi: 10.1210/en.2011-0281.

Flamment, M., Hajduch, E., Ferré, P. and Foulle, F. (2012) 'New insights into ER stress-induced insulin resistance', *Trends in Endocrinology and Metabolism*, pp. 381–390. doi: 10.1016/j.tem.2012.06.003.

Fon Tacer, K., Bookout, A. L., Ding, X., Kurosu, H., John, G. B., Wang, L., Goetz, R., Mohammadi, M., Kuro-o, M., Mangelsdorf, D. J. and Kliewer, S. a (2010) 'Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse.', *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 24(10), pp. 2050–2064. doi: 10.1210/me.2010-0142.

Fried, S. and Ricci, M. (2000) 'Regulation of leptin production in humans', *The Journal of Nutrition*, pp. 3127–3131.

Friedman, J. M. and Halaas, J. L. (1998) 'Leptin and the regulation of body weight in mammals.', *Nature*, 395(6704), pp. 763–770. doi: 10.1038/27376.

Frühbeck, G., Méndez-Giménez, L., Fernández-Formoso, J.-A., Fernández, S. and Rodríguez, A. (2014) 'Regulation of adipocyte lipolysis', *Nutrition*

Research Reviews, 27(1), pp. 63–93. doi: 10.1017/S095442241400002X.

Fu, S., Watkins, S. M. and Hotamisligil, G. S. (2012) 'The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling', *Cell Metabolism*, pp. 623–634. doi: 10.1016/j.cmet.2012.03.007.

Gaich, G., Chien, J. Y., Fu, H., Glass, L. C., Deeg, M. A., Holland, W. L., Kharitonov, A., Bumol, T., Schilske, H. K. and Moller, D. E. (2013) 'The effects of LY2405319, an FGF21 Analog, in obese human subjects with type 2 diabetes', *Cell Metabolism*, 18(3), pp. 333–340. doi: 10.1016/j.cmet.2013.08.005.

Gallego-Escuredo, J. M., Domingo, P., Gutiérrez, M. D. M., Mateo, M. G., Cabeza, M. C., Fontanet, A., Vidal, F., Domingo, J. C., Giralt, M. and Villarroya, F. (2012) 'Reduced levels of serum FGF19 and impaired expression of receptors for endocrine FGFs in adipose tissue from HIV-infected patients.', *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 61(5), pp. 527–34. doi: 10.1097/QAI.0b013e318271c2c7.

Gallego-Escuredo, J. M., Gómez-Ambrosi, J., Catalan, V., Domingo, P., Giralt, M., Frühbeck, G. and Villarroya, F. (2015) 'Opposite alterations in FGF21 and FGF19 levels and disturbed expression of the receptor machinery for endocrine FGFs in obese patients.', *International journal of obesity (2005)*, 39(April 2014), pp. 121–129. doi: 10.1038/ijo.2014.76.

Gallego-Escuredo, J. M., Lamarca, M. K., Villarroya, J., Domingo, J. C., Mateo, M. G., Gutierrez, M. del M., Vidal, F., Villarroya, F., Domingo, P. and Giralt, M. (2017) 'High FGF21 levels are associated with altered bone homeostasis in HIV-1-infected patients', *Metabolism: Clinical and Experimental*, 71, pp. 163–170. doi: 10.1016/j.metabol.2017.03.014.

Gallego-Escuredo, J. M., Del Mar Gutierrez, M., Diaz-Delfin, J., Domingo, J. C., Mateo, M. G., Domingo, P., Giralt, M. and Villarroya, F. (2010) 'Differential effects of efavirenz and lopinavir/ritonavir on human adipocyte differentiation, gene expression and release of adipokines and pro-inflammatory cytokines.', *Current HIV research*, 8(7), pp. 545–553. doi:

10.2174/157016210793499222.

- Gälman, C., Lundåsen, T., Kharitononkov, A., Bina, H. A., Eriksson, M., Hafström, I., Dahlin, M., Åmark, P., Angelin, B. and Rudling, M. (2008) 'The Circulating Metabolic Regulator FGF21 Is Induced by Prolonged Fasting and PPAR α Activation in Man', *Cell Metabolism*, 8(2), pp. 169–174. doi: 10.1016/j.cmet.2008.06.014.
- Garg, A. (2011) 'Lipodystrophies: Genetic and Acquired Body Fat Disorders', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(11), pp. 3313–3325. doi: 10.1210/jc.2011-1159.
- Gazzard, B., Anderson, J., Babiker, A., Boffito, M., Brook, G., Brough, G., Churchill, D., Cromarty, B., Das, S., Fisher, M., Freedman, A., Geretti, A. M., Johnson, M., Leen, C., Nair, D., Peters, B., Phillips, A., Pillay, D., Pozniak, A., Walsh, J., Wilkins, E., Williams, I., Williams, M. and Youle, M. (2008) 'British HIV Association guidelines for the treatment of HIV-1-infected adults with antiretroviral therapy 2008', *HIV Medicine*, pp. 563–608. doi: 10.1111/j.1468-1293.2008.00636.x.
- Giralt, A., Hondares, E., Villena, J. A., Ribas, F., Díaz-Delfín, J., Giralt, M., Iglesias, R. and Villarroya, F. (2011) 'Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α controls transcription of the Sirt3 gene, an essential component of the thermogenic brown adipocyte phenotype', *Journal of Biological Chemistry*, 286(19), pp. 16958–16966. doi: 10.1074/jbc.M110.202390.
- Giralt, M., Domingo, P., Guallar, J. P., Rodríguez de la Concepción, M. L., Alegre, M., Domingo, J. C. and Villarroya, F. (2006) 'HIV-1 infection alters gene expression in adipose tissue, which contributes to HIV-1/HAART-associated lipodystrophy.', *Antiviral therapy*, 11(February), pp. 729–740.
- Giralt, M., Domingo, P. and Villarroya, F. (2011) 'Adipose tissue biology and HIV-infection', *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 25(3), pp. 487–499. doi: 10.1016/j.beem.2010.12.001.
- Giralt, M., Gavaldà-Navarro, A. and Villarroya, F. (2015) 'Fibroblast growth factor-

- 21, energy balance and obesity', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 418, pp. 66–73. doi: 10.1016/j.mce.2015.09.018.
- Giralt, M. and Villarroya, F. (2013) 'White, brown, beige/brite: Different adipose cells for different functions?', *Endocrinology*, pp. 2992–3000. doi: 10.1210/en.2013-1403.
- Goetz, R. and Mohammadi, M. (2013) 'Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(3), pp. 166–180. doi: 10.1038/nrm3528.
- Golozoubova, V. (2001) 'Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold', *The FASEB Journal*. doi: 10.1096/fj.00-0536fje.
- Guallar, J. P., Gallego-Escuredo, J. M., Domingo, J. C., Alegre, M., Fontdevila, J., Martínez, E., Hammond, E. L., Domingo, P., Giralt, M. and Villarroya, F. (2008) 'Differential gene expression indicates that "buffalo hump" is a distinct adipose tissue disturbance in HIV-1-associated lipodystrophy.', *AIDS (London, England)*, 22(December 2007), pp. 575–584. doi: 10.1097/QAD.0b013e3282f56b40.
- Guaraldi, G., Orlando, G., Squillace, N., Roverato, A., De Fazio, D., Vandelli, M., Nardini, G., Beghetto, B., De Paola, M., Esposito, R. and Palella, F. (2007) 'Prevalence of and risk factors for pubic lipoma development in HIV-infected persons.', *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 45(1), pp. 72–76. doi: 10.1097/QAI.0b013e31804a85b0.
- El Hadri, K., Glorian, M., Monsempes, C., Dieudonné, M. N., Pecquery, R., Giudicelli, Y., Andreani, M., Dugail, I. and Fève, B. (2004) 'In Vitro Suppression of the Lipogenic Pathway by the Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Efavirenz in 3T3 and Human Preadipocytes or Adipocytes', *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), pp. 15130–15141. doi: 10.1074/jbc.M312875200.
- Hall, K. D., Heymsfield, S. B., Kemnitz, J. W., Klein, S., Schoeller, D. A. and

- Speakman, J. R. (2012) 'Energy balance and its components: Implications for body weight regulation', *American Journal of Clinical Nutrition*, pp. 989–994. doi: 10.3945/ajcn.112.036350.
- Haman, F. (2006) 'Shivering in the cold: from mechanisms of fuel selection to survival', *Journal of Applied Physiology*, 100(5), pp. 1702–1708. doi: 10.1152/jappphysiol.01088.2005.
- Hammer, S. M., Eron, J. J., Reiss, P., Schooley, R. T., Thompson, M. a, Walmsley, S., Cahn, P., Fischl, M. a, Gatell, J. M., Hirsch, M. S., Jacobsen, D. M., Montaner, J. S. G., Richman, D. D., Yeni, P. G. and Volberding, P. a (2008) 'Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel.', *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 300(5), pp. 555–570. doi: 10.1001/jama.300.5.555.
- Han, J., Back, S. H., Hur, J., Lin, Y.-H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C. L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., Kilberg, M. S., Sartor, M. A. and Kaufman, R. J. (2013) 'ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death', *Nature Cell Biology*, 15(5), pp. 481–90. doi: 10.1038/ncb2738.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Scheuner, D., Chen, J.-J., Kaufman, R. J. and Ron, D. (2009) 'Ppp1r15 gene knockout reveals an essential role for translation initiation factor 2 alpha (eIF2alpha) dephosphorylation in mammalian development.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(6), pp. 1832–7. doi: 10.1073/pnas.0809632106.
- Harms, M. and Seale, P. (2013) 'Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential', *Nat Med*, 19(10), pp. 1252–1263. doi: 10.1038/nm.3361.
- Harwood, H. J. (2012) 'The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis', *Neuropharmacology*, pp. 57–75. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.12.010.

- Haubrich, R. H., Riddler, S. A., DiRienzo, A. G., Komarow, L., Powderly, W. G., Klingman, K., Garren, K. W., Butcher, D. L., Rooney, J. F., Haas, D. W., Mellors, J. W. and Havlir, D. V (2009) 'Metabolic outcomes in a randomized trial of nucleoside, nonnucleoside and protease inhibitor-sparing regimens for initial HIV treatment', *AIDS*, 23(9), pp. 1109–1118. doi: 10.1097/QAD.0b013e32832b4377.
- Hazan, U., Romero, I. A., Canello, R., Valente, S., Perrin, V., Mariot, V., Dumonceaux, J., Gerhardt, C. C., Strosberg, A. D., Couraud, P.-O. and Pietri-Rouxel, F. (2002) 'Human adipose cells express CD4, CXCR4, and CCR5 [corrected] receptors: a new target cell type for the immunodeficiency virus-1?', *FASEB journal*, 16(10), pp. 1254–6. doi: 10.1096/fj.01-0947fje.
- He, Z., Jiang, T., Wang, Z., Levi, M. and Li, J. (2004) 'Modulation of carbohydrate response element-binding protein gene expression in 3T3-L1 adipocytes and rat adipose tissue.', *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 287(3), pp. E424-30. doi: 10.1152/ajpendo.00568.2003.
- Hollien, J. and Weissman, J. S. (2006) 'Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response', *Science*, 313(5783), pp. 104–107. doi: 10.1126/science.1129631.
- Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F. J., Giralt, M., Mampel, T. and Villarroya, F. (2011) 'Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue', *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), pp. 12983–12990. doi: 10.1074/jbc.M110.215889.
- Hondares, E., Rosell, M., Gonzalez, F. J., Giralt, M., Iglesias, R. and Villarroya, F. (2010) 'Hepatic FGF21 Expression Is Induced at Birth via PPAR?? in Response to Milk Intake and Contributes to Thermogenic Activation of Neonatal Brown Fat', *Cell Metabolism*, 11(3), pp. 206–212. doi: 10.1016/j.cmet.2010.02.001.
- Hotta, Y., Nakamura, H., Konishi, M., Murata, Y., Takagi, H., Matsumura, S., Inoue, K., Fushiki, T. and Itoh, N. (2009) 'Fibroblast growth factor 21

regulates lipolysis in white adipose tissue but is not required for ketogenesis and triglyceride clearance in liver.', *Endocrinology*, 150(10), pp. 4625–33. doi: 10.1210/en.2009-0119.

Iizuka, K., Takeda, J. and Horikawa, Y. (2009) 'Glucose induces FGF21 mRNA expression through ChREBP activation in rat hepatocytes', *FEBS Letters*, 583(17), pp. 2882–2886. doi: 10.1016/j.febslet.2009.07.053.

Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., Li, Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Esser, V., Elmquist, J. K., Gerard, R. D., Burgess, S. C., Hammer, R. E., Mangelsdorf, D. J. and Kliewer, S. a. (2007) 'Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21.', *Cell metabolism*, 5(6), pp. 415–25. doi: 10.1016/j.cmet.2007.05.003.

Ishibashi, J. and Seale, P. (2010) 'Beige Can Be Slimming', *Science*, 328(5982), pp. 1113–1114. doi: 10.1126/science.1190816.

Itoh, N. and Ornitz, D. M. (2004) 'Evolution of the Fgf and Fgfr gene families', *Trends in Genetics*, pp. 563–569. doi: 10.1016/j.tig.2004.08.007.

Itoh, N. and Ornitz, D. M. (2008) 'Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family', *Developmental Dynamics*, pp. 18–27. doi: 10.1002/dvdy.21388.

Itoh, N. and Ornitz, D. M. (2011) 'Fibroblast growth factors: From molecular evolution to roles in development, metabolism and disease', *Journal of Biochemistry*, pp. 121–130. doi: 10.1093/jb/mvq121.

Jackson, A., Hill, A., Puls, R., Else, L., Amin, J., Back, D., Lin, E., Khoo, S., Emery, S., Morley, R., Gazzard, B. and Boffito, M. (2011) 'Pharmacokinetics of plasma lopinavir/ritonavir following the administration of 400/100 mg, 200/150 mg and 200/50 mg twice daily in HIV-negative volunteers', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(3), pp. 635–640. doi: 10.1093/jac/dkq468.

- Jespersen, N. Z., Larsen, T. J., Peijs, L., Dagaard, S., Homøe, P., Loft, A., De Jong, J., Mathur, N., Cannon, B., Nedergaard, J., Pedersen, B. K., Møller, K. and Scheele, C. (2013) 'A classical brown adipose tissue mrna signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans', *Cell Metabolism*, 17(5), pp. 798–805. doi: 10.1016/j.cmet.2013.04.011.
- Jiang, S., Yan, C., Fang, Q. C., Shao, M. Le, Zhang, Y. L., Liu, Y., Deng, Y. P., Shan, B., Liu, J. Q., Li, H. T., Yong, L., Zhou, J., Dai, Z., Liu, Y. and Jia, W. P. (2014) 'Fibroblast growth factor 21 is regulated by the IRE1 α -XBP1 branch of the unfolded protein response and counteracts endoplasmic reticulum stress-induced hepatic steatosis', *Journal of Biological Chemistry*, 289(43), pp. 29751–29765. doi: 10.1074/jbc.M114.565960.
- de Jong, J. M. A., Larsson, O., Cannon, B. and Nedergaard, J. (2015) 'A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers', *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 308(12), pp. E1085–E1105. doi: 10.1152/ajpendo.00023.2015.
- K**ajimura, S., Seale, P., Kubota, K., Lunsford, E., Frangioni, J. V., Gygi, S. P. and Spiegelman, B. M. (2009) 'Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16–C/EBP- β transcriptional complex', *Nature*, 460(7259), pp. 1154–1158. doi: 10.1038/nature08262.
- Kaufman, R. J. and Malhotra, J. D. (2014) 'Calcium trafficking integrates endoplasmic reticulum function with mitochondrial bioenergetics', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, pp. 2233–2239. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.03.022.
- Kersten, S. (2001) 'Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis', *EMBO Reports*, pp. 282–286. doi: 10.1093/embo-reports/kve071.
- Kharitonov, A., Dunbar, J. D., Bina, H. A., Bright, S., Moyers, J. S., Zhang, C., Ding, L., Micanovic, R., Mehrbod, S. F., Knierman, M. D., Hale, J. E., Coskun, T. and Shanafelt, A. B. (2008) 'FGF-21/FGF-21 receptor

- interaction and activation is determined by β Klotho', *Journal of Cellular Physiology*, 215(1), pp. 1–7. doi: 10.1002/jcp.21357.
- Kharitononkov, A. and Larsen, P. (2011) 'FGF21 reloaded: Challenges of a rapidly growing field', *Trends in Endocrinology and Metabolism*, pp. 81–86. doi: 10.1016/j.tem.2010.11.003.
- Kharitononkov, A., Shiyanova, T. L., Koester, A., Ford, A. M., Micanovic, R., Galbreath, E. J., Sandusky, G. E., Hammond, L. J., Moyers, J. S., Owens, R. A., Gromada, J., Brozinick, J. T., Hawkins, E. D., Wroblewski, V. J., Li, D. S., Mehrbod, F., Jaskunas, S. R. and Shanafelt, A. B. (2005) 'FGF-21 as a novel metabolic regulator', *Journal of Clinical Investigation*, 115(6), pp. 1627–1635. doi: 10.1172/JCI23606.
- Kim, S. H., Kim, K. H., Kim, H. K., Kim, M. J., Back, S. H., Konishi, M., Itoh, N. and Lee, M. S. (2015) 'Fibroblast growth factor 21 participates in adaptation to endoplasmic reticulum stress and attenuates obesity-induced hepatic metabolic stress', *Diabetologia*, 58(4), pp. 809–818. doi: 10.1007/s00125-014-3475-6.
- Klimas, N., Koneru, A. O. and Fletcher, M. A. (2008) 'Overview of HIV', *Psychosomatic Medicine*, 70(5), pp. 523–530. doi: 10.1097/PSY.0b013e31817ae69f.
- Krauss, S., Zhang, C.-Y. and Lowell, B. B. (2005) 'The mitochondrial uncoupling-protein homologues', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(3), pp. 248–261. doi: 10.1038/nrm1592.
- Kuo, M. M. C., Kim, S., Tseng, C. Y., Jeon, Y. H., Choe, S. and Lee, D. K. (2014) 'BMP-9 as a potent brown adipogenic inducer with anti-obesity capacity', *Biomaterials*, 35(10), pp. 3172–3179. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.063.
- Kurosu, H., Choi, M., Ogawa, Y., Dickson, A. S., Goetz, R., Eliseenkova, A. V., Mohammadi, M., Rosenblatt, K. P., Kliwer, S. A. and Kuro-o, M. (2007) 'Tissue-specific Expression of betaKlotho and Fibroblast Growth Factor (FGF) Receptor Isoforms Determines Metabolic Activity of FGF19 and

FGF21', *Journal of Biological Chemistry*, 282(37), pp. 26687–26695. doi: 10.1074/jbc.M704165200.

Lee, Y. H., Petkova, A. P., Mottillo, E. P. and Granneman, J. G. (2012) 'In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by β 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding', *Cell Metabolism*, 15(4), pp. 480–491. doi: 10.1016/j.cmet.2012.03.009.

Leferova, M. I. and Lazar, M. A. (2009) 'New developments in adipogenesis', *Trends in Endocrinology and Metabolism*, pp. 107–114. doi: 10.1016/j.tem.2008.11.005.

Li, S., Shin, H. J., Ding, E. L. and van Dam, R. M. (2009) 'Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis.', *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 302(2), pp. 179–188. doi: 10.1001/jama.2009.976.

Lichtenbelt, W. V. M., Kingma, B., Lans, A. Van Der and Schellen, L. (2014) 'Cold exposure – an approach to increasing energy expenditure in humans', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 25(4), pp. 165–167. doi: 10.1016/j.tem.2014.01.001.

Lidell, M. E., Betz, M. J., Leinhard, O. D., Heglind, M., Elander, L., Slawik, M., Mussack, T., Nilsson, D., Romu, T., Nuutila, P., Virtanen, K. A., Beuschlein, F., Persson, A., Borga, M. and Enerbäck, S. (2013) 'Evidence for two types of brown adipose tissue in humans', *Nature Medicine*, 19(5), pp. 631–634. doi: 10.1038/nm.3017.

Lihn, A. S., Richelsen, B., Pedersen, S. B., Haugaard, S. B., Rathje, G. S., Madsbad, S. and Andersen, O. (2003) 'Increased expression of TNF- α , IL-6, and IL-8 in HALS: implications for reduced adiponectin expression and plasma levels.', *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 285(5), pp. E1072–E1080. doi: 10.1152/ajpendo.00206.2003.

Lin, J. H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H. R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K.

- M., Lavail, M. M. and Walter, P. (2007) 'IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response.', *Science (New York, N.Y.)*, 318(5852), pp. 944–9. doi: 10.1126/science.1146361.
- Lin, Z., Tian, H., Lam, K. S. L., Lin, S., Hoo, R. C. L., Konishi, M., Itoh, N., Wang, Y., Bornstein, S. R., Xu, A. and Li, X. (2013) 'Adiponectin Mediates the Metabolic Effects of FGF21 on Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity in Mice', *Cell Metabolism*, 17(5), pp. 779–789. doi: 10.1016/j.cmet.2013.04.005.
- Lindegård, B., Hvid, T., Grøndahl, T., Frosig, C., Gerstoft, J., Hojman, P. and Pedersen, B. K. (2013) 'Expression of fibroblast growth factor-21 in muscle is associated with lipodystrophy, insulin resistance and lipid disturbances in patients with HIV.', *PloS one*. Edited by M. Müller, 8(3), p. e55632. doi: 10.1371/journal.pone.0055632.
- Lo, J. C., Mulligan, K., Tai, V. W., Algren, H. and Schambelan, M. (1998) "Buffalo hump" in men with HIV-1 infection', *Lancet*, 351(9106), pp. 867–870. doi: 10.1016/S0140-6736(97)11443-X.
- de Luca, C. and Olefsky, J. M. (2008) 'Inflammation and insulin resistance', *FEBS Letters*, pp. 97–105. doi: 10.1016/j.febslet.2007.11.057.
- Lundåsen, T., Hunt, M. C., Nilsson, L. M., Sanyal, S., Angelin, B., Alexson, S. E. H. and Rudling, M. (2007) 'PPAR α is a key regulator of hepatic FGF21', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 360(2), pp. 437–440. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.06.068.
- M**alhotra, J. D., Miao, H., Zhang, K., Wolfson, A., Pennathur, S., Pipe, S. W. and Kaufman, R. J. (2008) 'Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(47), pp. 18525–18530. doi: 10.1073/pnas.0809677105.
- Marciniak, S. J., Yun, C. Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H. P. and Ron, D. (2004) 'CHOP induces death by

- promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum', *Genes and Development*, 18(24), pp. 3066–3077. doi: 10.1101/gad.1250704.
- Markan, K. R., Naber, M. C., Ameka, M. K., Anderegg, M. D., Mangelsdorf, D. J., Kliewer, S. A., Mohammadi, M. and Potthoff, M. J. (2014) 'Circulating FGF21 Is Liver Derived and Enhances Glucose Uptake During Refeeding and Overfeeding', *Diabetes*, 63(12), pp. 4057–4063. doi: 10.2337/db14-0595.
- Markan, K. R., Naber, M. C., Small, S. M., Peltekian, L., Kessler, R. L., Potthoff, M. J. and al., et (2017) 'FGF21 resistance is not mediated by downregulation of beta-klotho expression in white adipose tissue', *Molecular Metabolism*. Elsevier, 63(0), pp. 2924–2934. doi: 10.1016/j.molmet.2017.03.009.
- Van Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhommerig, J. W., Smulders, N. M., Drossaerts, J. M. A. F. L., Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., Schrauwen, P. and Teule, G. J. J. (2009) 'Cold-activated brown adipose tissue in healthy men.', *The New England journal of medicine*, 360(15), pp. 1500–1508. doi: 10.1056/NEJMoa0808718.
- Mason, I. (2007) 'Initiation to end point: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development.', *Nature reviews. Neuroscience*, 8(8), pp. 583–596. doi: 10.1038/nrn2189.
- Maurin, T., Saillan-Barreau, C., Cousin, B., Casteilla, L., Doglio, A. and Pénicaud, L. (2005) 'Tumor necrosis factor-alpha stimulates HIV-1 production in primary culture of human adipocytes.', *Experimental cell research*, 304(2), pp. 544–551. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.12.003.
- McLean, K., VanDeVen, N. A., Sorenson, D. R., Daudi, S. and Liu, J. R. (2009) 'The HIV protease inhibitor saquinavir induces endoplasmic reticulum stress, autophagy, and apoptosis in ovarian cancer cells', *Gynecologic Oncology*, 112(3), pp. 623–630. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.11.028.
- Miehle, K., Ebert, T., Kralisch, S., Hoffmann, A., Kratzsch, J., Schlögl, H.,

- Stumvoll, M. and Fasshauer, M. (2016) 'Serum concentrations of fibroblast growth factor 21 are elevated in patients with congenital or acquired lipodystrophy', *Cytokine*, 83, pp. 239–244. doi: 10.1016/j.cyto.2016.04.015.
- Minami, R., Yamamoto, M., Takahama, S., Ando, H., Miyamura, T. and Suematsu, E. (2011) 'Comparison of the influence of four classes of HIV antiretrovirals on adipogenic differentiation: The minimal effect of raltegravir and atazanavir', *Journal of Infection and Chemotherapy*, 17(2), pp. 183–188. doi: 10.1007/s10156-010-0101-5.
- Moreno-Navarrete, J. M., Ortega, F., Sabater, M., Ricart, W., Fernández-Real, J. M. and Fernandez-Real, J. M. (2010) 'Telomere length of subcutaneous adipose tissue cells is shorter in obese and formerly obese subjects', *International Journal of Obesity (London)*, 34(8), pp. 1345–1348. doi: 10.1038/ijo.2010.49.
- Morrison, S. F., Madden, C. J. and Tupone, D. (2014) 'Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure', *Cell Metabolism*, pp. 741–756. doi: 10.1016/j.cmet.2014.02.007.
- Moure, R., Domingo, P., Gallego-Escuredo, J. M., Villarroja, J., Gutierrez, M. D. M., Mateo, M. G., Domingo, J. C., Giralt, M. and Villarroja, F. (2016) 'Impact of elvitegravir on human adipocytes: Alterations in differentiation, gene expression and release of adipokines and cytokines.', *Antiviral research*, 132, pp. 59–65. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.05.013.
- Muise, E. S., Azzolina, B., Kuo, D. W., El-Sherbeini, M., Tan, Y., Yuan, X., Mu, J., Thompson, J. R., Berger, J. P. and Wong, K. K. (2008) 'Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and altered metabolic states.', *Molecular pharmacology*, 74(2), pp. 403–412. doi: 10.1124/mol.108.044826.ponectin.
- Mustajoki, P. (2015) '[Obesogenic food environment explains most of the obesity epidemic].', *Duodecim; laaketieteellinen aikakauskirja*, 131(15), pp. 1345–

52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26427233>
(Accessed: 29 May 2017).

Nedergaard, J., Bengtsson, T. and Cannon, B. (2007) 'Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans.', *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 293(2), pp. E444-52. doi: 10.1152/ajpendo.00691.2006.

Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M. and Itoh, N. (2000) 'Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver', *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1492(1), pp. 203–206. doi: 10.1016/S0167-4781(00)00067-1.

Oelkrug, R., Goetze, N., Exner, C., Lee, Y., Ganjam, G. K., Kutschke, M., Müller, S., Stöhr, S., Tschöp, M. H., Crichton, P. G., Heldmaier, G., Jastroch, M. and Meyer, C. W. (2013) 'Brown fat in a protoendothermic mammal fuels eutherian evolution', *Nature Communications*, 4. doi: 10.1038/ncomms3140.

Ornitz, D. M. and Itoh, N. (2001) 'Protein family review Fibroblast growth factors Gene organization and evolutionary history', *Genome Biology*, 2(reviews), pp. 1–12. doi: 10.1186/gb-2001-2-3-reviews3005.

Otake, K., Omoto, S., Yamamoto, T., Okuyama, H., Okada, H., Okada, N., Kawai, M., Saksena, N. K. and Fujii, Y. R. (2004) 'HIV-1 Nef protein in the nucleus influences adipogenesis as well as viral transcription through the peroxisome proliferator-activated receptors', *AIDS*, 18(2), pp. 189–198. doi: 10.1097/00002030-200401230-00007.

Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J. and Walsh, K. (2011) 'Adipokines in inflammation and metabolic disease', *Nature Reviews Immunology*, 11(2), pp. 85–97. doi: 10.1038/nri2921.

Owen, B. M., Ding, X., Morgan, D. A., Coate, K. C., Bookout, A. L., Rahmouni, K., Kliwer, S. A. and Mangelsdorf, D. J. (2014) 'FGF21 acts centrally to

induce sympathetic nerve activity, energy expenditure, and weight loss', *Cell Metabolism*, 20(4), pp. 670–677. doi: 10.1016/j.cmet.2014.07.012.

Owen, B. M., Mangelsdorf, D. J. and Kliewer, S. A. (2015) 'Tissue-specific actions of the metabolic hormones FGF15/19 and FGF21.', *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 26(1), pp. 22–9. doi: 10.1016/j.tem.2014.10.002.

Pacenti, M., Barzon, L., Favaretto, F., Fincati, K., Romano, S., Milan, G., Vettor, R. and Palù, G. (2006) 'Microarray analysis during adipogenesis identifies new genes altered by antiretroviral drugs.', *AIDS (London, England)*, 20(13), pp. 1691–705. doi: 10.1097/01.aids.0000242815.80462.5a.

Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljubic, M., Samali, A. and Gorman, A. M. (2016) 'The integrated stress response', *EMBO reports*, 17(10), pp. 1374–1395. doi: 10.15252/embr.201642195.

Paruthi, J., Gill, N. and Mantzoros, C. S. (2013) 'Adipokines in the HIV/HAART-associated lipodystrophy syndrome', *Metabolism: Clinical and Experimental*, pp. 1199–1205. doi: 10.1016/j.metabol.2013.04.014.

Patel, L., Buckels, A. C., Kinghorn, I. J., Murdock, P. R., Holbrook, J. D., Plumpton, C., Macphee, C. H. and Smith, S. A. (2003) 'Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR?? activators', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300(2), pp. 472–476. doi: 10.1016/S0006-291X(02)02841-3.

Peck, M. D., Mantero-Atienza, E., Miguez-Burbano, M. J., Fletcher, M. A., Shor-Posner, G. and Baum, M. K. (1993) 'The esterified plasma fatty acid profile is altered in early HIV-1 infection', *Lipids*, 28(7), pp. 593–597. doi: 10.1007/BF02536052.

Pérez-matute, P., Pérez-Martínez, L., Blanco, J. R. and Oteo, J. A. (2011) 'Neutral actions of Raltegravir on adipogenesis, glucose metabolism and lipolysis in 3T3-L1 adipocytes.', *Current HIV Research*, 9, pp. 174–9. doi: 10.2174/157016211795945278.

- Pérez-Molina, J. A., Domingo, P., Martínez, E. and Moreno, S. (2008) 'The role of efavirenz compared with protease inhibitors in the body fat changes associated with highly active antiretroviral therapy', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, pp. 234–245. doi: 10.1093/jac/dkn191.
- Planavila, A., Redondo-Angulo, I., Ribas, F., Garrabou, G., Casademont, J., Giralt, M. and Villarroya, F. (2015) 'Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress', *Cardiovascular Research*, 106(1), pp. 19–31. doi: 10.1093/cvr/cvu263.
- Planavila, A., Redondo-Angulo, I. and Villarroya, F. (2015) 'FGF21 and Cardiac Physiopathology', *Frontiers in Endocrinology*, 6. doi: 10.3389/fendo.2015.00133.
- Potthoff, M. J., Inagaki, T., Satapati, S., Ding, X., He, T., Goetz, R., Mohammadi, M., Finck, B. N., Mangelsdorf, D. J., Kliewer, S. A. and Burgess, S. C. (2009) 'FGF21 induces PGC-1 α and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(26), pp. 10853–10858. doi: 10.1073/pnas.0904187106.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M. and Spiegelman, B. M. (1998) 'A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis', *Cell*, 92(6), pp. 829–839. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81410-5.
- Q**uesada-López, T., Cereijo, R., Turatsinze, J.-V., Planavila, A., Cairó, M., Gavalda-Navarro, A., Peyrou, M., Moure, R., Iglesias, R., Giralt, M., Eizirik, D. L. and Villarroya, F. (2016) 'The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes', *Nature Communications*, 7, p. 13479. doi: 10.1038/ncomms13479.
- R**amanathan, S., Mathias, A. A., German, P. and Kearney, B. P. (2011) 'Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of the HIV integrase inhibitor elvitegravir', *Clinical Pharmacokinetics*, pp. 229–244. doi: 10.2165/11584570-000000000-00000.

- Rasmussen, A. (1923) *The so-called hibernating gland*. Available at: <http://www.worldcat.org/title/so-called-hibernating-gland/oclc/84120030> (Accessed: 31 May 2017).
- Ribas, F., Villarroya, J., Hondares, E., Giralt, M. and Villarroya, F. (2014) 'FGF21 expression and release in muscle cells: involvement of MyoD and regulation by mitochondria-driven signalling', *Biochem J*, 199, pp. 191–199. doi: 10.1042/bj20140403.
- Ribas, F., Villarroya, J., Hondares, E., Giralt, M. and Villarroya, F. (2014) 'FGF21 expression and release in muscle cells: involvement of MyoD and regulation by mitochondria-driven signalling', *Biochemical Journal*, 463(2), pp. 191–199. doi: 10.1042/BJ20140403.
- Rutkowski, D. T., Arnold, S. M., Miller, C. N., Wu, J., Li, J., Gunnison, K. M., Mori, K., Akha, A. A. S., Raden, D. and Kaufman, R. J. (2006) 'Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins', *PLoS Biology*, 4(11), pp. 2024–2041. doi: 10.1371/journal.pbio.0040374.
- Ryo, M., Nakamura, T., Kihara, S., Kumada, M., Shibazaki, S., Takahashi, M., Nagai, M., Matsuzawa, Y. and Funahashi, T. (2004) 'Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome.', *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, 68(11), pp. 975–81. doi: 10.1253/circj.68.975.
- S**aito, M., Okamatsu-Ogura, Y., Matsushita, M., Watanabe, K., Yoneshiro, T., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Miyagawa, M., Kameya, T., Nakada, K., Kawai, Y. and Tsujisaki, M. (2009) 'High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: Effects of cold exposure and adiposity', *Diabetes*, 58(7), pp. 1526–1531. doi: 10.2337/db09-0530.
- Samms, R. J., Cheng, C. C., Kharitonov, A., Gimeno, R. E. and Adams, A. C. (2016) 'Overexpression of *klotho* in adipose tissue sensitizes male mice to endogenous FGF21 and provides protection from diet-induced obesity', *Endocrinology*, 157(4), pp. 1467–1480. doi: 10.1210/en.2015-

- Sanchez-Gurmaches, J. and Guertin, D. A. (2014) 'Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed', *Nature Communications*, 5. doi: 10.1038/ncomms5099.
- Sanchez-Gurmaches, J., Hung, C. M., Sparks, C. A., Tang, Y., Li, H. and Guertin, D. A. (2012) 'PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors', *Cell Metabolism*, 16(3), pp. 348–362. doi: 10.1016/j.cmet.2012.08.003.
- Sarruf, D. A., Thaler, J. P., Morton, G. J., German, J., Fischer, J. D., Ogimoto, K. and Schwartz, M. W. (2010) 'Fibroblast growth factor 21 action in the brain increases energy expenditure and insulin sensitivity in obese rats', *Diabetes*, 59(7), pp. 1817–1824. doi: 10.2337/db09-1878.
- Schaap, F. G., Kremer, A. E., Lamers, W. H., Jansen, P. L. M. and Gaemers, I. C. (2013) 'Fibroblast growth factor 21 is induced by endoplasmic reticulum stress', *Biochimie*, 95(4), pp. 692–699. doi: 10.1016/j.biochi.2012.10.019.
- Sharp, L. Z., Shinoda, K., Ohno, H., Scheel, D. W., Tomoda, E., Ruiz, L., Hu, H., Wang, L., Pavlova, Z., Gilsanz, V. and Kajimura, S. (2012) 'Human BAT Possesses Molecular Signatures That Resemble Beige/Brite Cells', *PLoS ONE*, 7(11). doi: 10.1371/journal.pone.0049452.
- Shrivastav, S., Kino, T., Cunningham, T., Ichijo, T., Schubert, U., Heinklein, P., Chrousos, G. P. and Kopp, J. B. (2008) 'Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 Viral Protein R Suppresses Transcriptional Activity of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and Inhibits Adipocyte Differentiation: Implications for HIV-Associated Lipodystrophy', *Molecular Endocrinology*, 22(2), pp. 234–247. doi: 10.1210/me.2007-0124.
- Skillington, J., Choy, L. and Derynck, R. (2002) 'Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of preadipocytes', *Journal of Cell Biology*, 159(1), pp. 135–146. doi: 10.1083/jcb.200204060.

- Smith, R. L., de Boer, R., Brul, S., Budovskaya, Y. and van der Spek, H. (2013) 'Premature and accelerated aging: HIV or HAART?', *Frontiers in Genetics*. doi: 10.3389/fgene.2012.00328.
- Somm, E., Henry, H., Bruce, S. J., Aeby, S., Rosikiewicz, M., Sykiotis, G. P., Asrih, M., Jornayvaz, F. R., Denechaud, P. D., Albrecht, U., Mohammadi, M., Dwyer, A., Acierno, J. S., Schoonjans, K., Fajas, L., Greub, G. and Pitteloud, N. (2017) ' β -Klotho deficiency protects against obesity through a crosstalk between liver, microbiota, and brown adipose tissue', *JCI Insight*, 2(8). doi: 10.1172/jci.insight.91809.
- Song, B., Scheuner, D., Ron, D., Pennathur, S. and Kaufman, R. J. (2008) 'Chop deletion reduces oxidative stress, improves ?? cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes', *Journal of Clinical Investigation*, 118(10), pp. 3378–3389. doi: 10.1172/JCI34587.
- Sottile, V. and Seuwen, K. (2000) 'Bone morphogenetic protein-2 stimulates adipogenic differentiation of mesenchymal precursor cells in synergy with BRL 49653 (rosiglitazone)', *FEBS Letters*, 475(3), pp. 201–204. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01655-0.
- De Sousa-Coelho, A. L., Marrero, P. F. and Haro, D. (2012) 'Activating transcription factor 4-dependent induction of FGF21 during amino acid deprivation', *Biochemical Journal*, 443(1), pp. 165–171. doi: 10.1042/BJ20111748.
- Srinivasa, S., Wong, K., Fitch, K. V., Wei, J., Petrow, E., Cypess, A. M., Torriani, M. and Grinspoon, S. K. (2015) 'Effects of lifestyle modification and metformin on irisin and FGF21 among HIV-infected subjects with the metabolic syndrome', *Clinical Endocrinology*, 82(5), pp. 678–685. doi: 10.1111/cen.12582.
- Steinberg, G. R. (2003) 'Endurance training partially reverses dietary-induced leptin resistance in rodent skeletal muscle', *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 286(1), p. 57E–63. doi: 10.1152/ajpendo.00302.2003.
- Steinberg, G. R., Parolin, M. L., Heigenhauser, G. J. F. and Dyck, D. J. (2002)

'Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance', *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 283(1), pp. E187–E192. doi: 10.1152/ajpendo.00542.2001.

Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., Patel, H. R., Ahima, R. S. and Lazar, M. A. (2001) 'The hormone resistin links obesity to diabetes', *Nature*, 409(6818), pp. 307–312. doi: 10.1038/35053000.

Sun, K., Tordjman, J., Clément, K. and Scherer, P. E. (2013) 'Fibrosis and adipose tissue dysfunction', *Cell Metabolism*, pp. 470–477. doi: 10.1016/j.cmet.2013.06.016.

Suomalainen, A. (2013) 'Fibroblast growth factor 21: a novel biomarker for human muscle-manifesting mitochondrial disorders.', *Expert opinion on medical diagnostics*, 7(4), pp. 313–7. doi: 10.1517/17530059.2013.812070.

Symonds, M. E., Henderson, K., Elvidge, L., Bosman, C., Sharkey, D., Perkins, A. C. and Budge, H. (2012) 'Thermal imaging to assess age-related changes of skin temperature within the supraclavicular region co-locating with brown adipose tissue in healthy children', *Journal of Pediatrics*, 161(5), pp. 892–898. doi: 10.1016/j.jpeds.2012.04.056.

Symonds, M. E., Pope, M. and Budge, H. (2015) 'The Ontogeny of Brown Adipose Tissue', *Annual Review of Nutrition*, 35(1), pp. 295–320. doi: 10.1146/annurev-nutr-071813-105330.

Sztalryd, C., Xu, G., Dorward, H., Tansey, J. T., Contreras, J. A., Kimmel, A. R. and Londos, C. (2003) 'Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation', *Journal of Cell Biology*, 161(6), pp. 1093–1103. doi: 10.1083/jcb.200210169.

Takada, I., Kouzmenko, A. P. and Kato, S. (2009) 'Wnt and PPAR γ signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis', *Nature Reviews Rheumatology*, 5(8), pp. 442–447. doi: 10.1038/nrrheum.2009.137.

- Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T. and Akira, S. (1997) 'Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene.', *The EMBO journal*, 16(24), pp. 7432–43. doi: 10.1093/emboj/16.24.7432.
- Tang, Q.-Q., Zhang, J.-W. and Daniel Lane, M. (2004) 'Sequential gene promoter interactions of C/EBPbeta, C/EBPalpha, and PPARgamma during adipogenesis.', *Biochemical and biophysical research communications*, 319(1), pp. 235–239. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.04.176.
- Taube, A., Schlich, R., Sell, H., Eckardt, K. and Eckel, J. (2012) 'Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases', *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 302(11), pp. H2148–H2165. doi: 10.1152/ajpheart.00907.2011.
- Thonberg, H., Fredriksson, J. M., Nedergaard, J. and Cannon, B. (2002) 'A novel pathway for adrenergic stimulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) phosphorylation: mediation via alpha1-adrenoceptors and protein kinase C activation.', *The Biochemical journal*, 364(Pt 1), pp. 73–9. doi: 10.1042/bj3640073.
- Tierney, E. P. and Hanke, C. W. (2010) "Bullfrog Neck," a Unique Morphologic Trait in HIV Lipodystrophy: Case Series and Review of the Literature', *Archives of Dermatology*, 146(11), pp. 1279–1282. doi: 10.1001/archdermatol.2010.341.
- Tiraby, C., Tavernier, G., Lefort, C., Larrouy, D., Bouillaud, F., Ricquier, D. and Langin, D. (2003) 'Acquirement of brown fat cell features by human white adipocytes.', *The Journal of biological chemistry*, 278(35), pp. 33370–6. doi: 10.1074/jbc.M305235200.
- Tontonoz, P. and Spiegelman, B. M. (2008) 'Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPARγ', *Annual Review of Biochemistry*, 77(1), pp. 289–312. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.061307.091829.
- Tseng, Y.-H., Kokkotou, E., Schulz, T. J., Huang, T. L., Winnay, J. N., Taniguchi, C. M., Tran, T. T., Suzuki, R., Espinoza, D. O., Yamamoto, Y., Ahrens, M. J., Dudley, A. T., Norris, A. W., Kulkarni, R. N. and Kahn, C. R. (2008)

'New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure', *Nature*, 454(7207), pp. 1000–1004. doi: 10.1038/nature07221.

Uebanso, T., Taketani, Y., Yamamoto, H., Amo, K., Ominami, H., Arai, H., Takei, Y., Masuda, M., Tanimura, A., Harada, N., Yamanaka-Okumura, H. and Takeda, E. (2011) 'Paradoxical regulation of human FGF21 by both fasting and feeding signals: Is FGF21 a nutritional adaptation factor?', *PLoS ONE*, 6(8). doi: 10.1371/journal.pone.0022976.

Vigouroux, C., Caron-Debarle, M., Le Dour, C., Magré, J. and Capeau, J. (2011) 'Molecular mechanisms of human lipodystrophies: From adipocyte lipid droplet to oxidative stress and lipotoxicity', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, pp. 862–876. doi: 10.1016/j.biocel.2011.03.002.

Vigouroux, C., Gharakhanian, S., Salhi, Y., Nguyễn, T. H., Adda, N., Rozenbaum, W. and Capeau, J. (1999) 'Adverse metabolic disorders during highly active antiretroviral treatments (HAART) of HIV disease.', *Diabetes & metabolism*, 25(5), pp. 383–92.

Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J. and Giral, M. (2016) 'Brown adipose tissue as a secretory organ', *Nature Reviews Endocrinology*. doi: 10.1038/nrendo.2016.136.

Villarroya, F., Domingo, P. and Giral, M. (2007) 'Lipodystrophy in HIV 1-infected patients: lessons for obesity research.', *International journal of obesity* (2005), 31(12), pp. 1763–76. doi: 10.1038/sj.ijo.0803698.

Villarroya, F., Domingo, P. and Giral, M. (2007) 'Mechanisms of antiretroviral-induced mitochondrial dysfunction in adipocytes and adipose tissue: in-vitro, animal and human adipose tissue studies', *Current Opinion in HIV and AIDS*, 2(4), pp. 261–267. doi: 10.1097/COH.0b013e32810fd785.

Villarroya, F., Domingo, P. and Giral, M. (2009) 'The importance of brown

adipose tissue.’, *The New England journal of medicine*, 361(4), p. 417; author reply 418-21.

Villarroya, F., Domingo, P. and Giralt, M. (2010) ‘Drug-induced lipotoxicity: Lipodystrophy associated with HIV-1 infection and antiretroviral treatment’, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, pp. 392–399. doi: 10.1016/j.bbalip.2009.09.018.

Villarroya, F., Iglesias, R. and Giralt, M. (2007) ‘PPARs in the control of uncoupling proteins gene expression’, *PPAR Research*. doi: 10.1155/2007/74364.

Villarroya, J., Diaz-Delfin, J., Hyink, D., Domingo, P., Giralt, M., Klotman, P. E. and Villarroya, F. (2010) ‘HIV type-1 transgene expression in mice alters adipose tissue and adipokine levels: Towards a rodent model of HIV type-1 lipodystrophy’, *Antiviral Therapy*, 15(7), pp. 1021–1028. doi: 10.3851/IMP1669.

Virtanen, K. A., Lidell, M. E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.-J., Enerbäck, S. and Nuutila, P. (2009) ‘Functional brown adipose tissue in healthy adults.’, *The New England journal of medicine*, 360(15), pp. 1518–25. doi: 10.1056/NEJMoa0808949.

Wan, X. S., Lu, X. H., Xiao, Y. C., Lin, Y., Zhu, H., Ding, T., Yang, Y., Huang, Y., Zhang, Y., Liu, Y. L., Xu, Z. M., Xiao, J. and Li, X. K. (2014) ‘ATF4- and CHOP-dependent induction of FGF21 through endoplasmic reticulum stress’, *BioMed Research International*, 2014. doi: 10.1155/2014/807874.

Wang, M. and Kaufman, R. J. (2016) ‘Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease’, *Nature*, 529(7586), pp. 326–335. doi: 10.1038/nature17041.

Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K. and Scherer, P. E. (2013) ‘Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration’, *Nature Medicine*, 19(10), pp. 1338–1344. doi: 10.1038/nm.3324.

- Wang, S., Chen, Z., Lam, V., Han, J., Hassler, J., Finck, B. N., Davidson, N. O. and Kaufman, R. J. (2012) 'IRE1 α -XBP1s induces PDI expression to increase MTP activity for hepatic VLDL assembly and lipid homeostasis', *Cell Metabolism*, 16(4), pp. 473–486. doi: 10.1016/j.cmet.2012.09.003.
- Wang, S. and Kaufman, R. J. (2012) 'The impact of the unfolded protein response on human disease', *The Journal of Cell Biology*, 197(7), pp. 857–867. doi: 10.1083/jcb.201110131.
- Wang, X., Wei, W., Krzeszinski, J. Y., Wang, Y. and Wan, Y. (2015) 'A Liver-Bone Endocrine Relay by IGFBP1 Promotes Osteoclastogenesis and Mediates FGF21-Induced Bone Resorption', *Cell Metabolism*, 22(5), pp. 811–824. doi: 10.1016/j.cmet.2015.09.010.
- Wang, Y., Vera, L., Fischer, W. H. and Montminy, M. (2009) 'The CREB coactivator CRTC2 links hepatic ER stress and fasting gluconeogenesis.', *Nature*, 460(7254), pp. 534–7. doi: 10.1038/nature08111.
- Wei, W., Dutchak, P. a., Wang, X., Ding, X., Wang, X., Bookout, a. L., Goetz, R., Mohammadi, M., Gerard, R. D., Dechow, P. C., Mangelsdorf, D. J., Kliewer, S. a. and Wan, Y. (2012) 'Fibroblast growth factor 21 promotes bone loss by potentiating the effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(8), pp. 3143–3148. doi: 10.1073/pnas.1200797109.
- Wente, W., Efanov, A. M., Brenner, M., Kharitonov, A., Köster, A., Sandusky, G. E., Sewing, S., Treinies, I., Zitzer, H. and Gromada, J. (2006) 'Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic beta-cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways.', *Diabetes*, 55(9), pp. 2470–2478. doi: 10.2337/db05-1435.
- Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A. H., Khandekar, M., Virtanen, K. A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., Van Marken Lichtenbelt, W. D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P. and Spiegelman, B. M. (2012) 'Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human', *Cell*, 150(2), pp. 366–376. doi:

10.1016/j.cell.2012.05.016.

Wu, Z., Rosen, E. D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A. E., McKeon, C., Darlington, G. J. and Spiegelman, B. M. (1999) 'Cross-regulation of C/EBP α and PPAR γ controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity', *Molecular Cell*, 3(2), pp. 151–158. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80306-8.

Xu, J., Lloyd, D. J., Hale, C., Stanislaus, S., Chen, M., Sivits, G., Vonderfecht, S. N., Hecht, R., Li, L., Lindberg, R. a, Chen, J. L., Jung, D. Y., Zhang, Z., Ko, H. J., Kim, J. K. and Veniant, M. M. (2009) 'FGF21 Reverses Hepatic Steatosis, Increases Energy Expenditure and Improves Insulin Sensitivity in Diet-induced Obese Mice', *Diabetes*, 58(January), pp. 250–259. doi: 10.2337/db08-0392.

Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai, R., Kahn, B. B. and Kadowaki, T. (2002) 'Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase', *Nature Medicine*, 8(11), pp. 1288–1295. doi: 10.1038/nm788.

Zamani, N. and Brown, C. W. (2011) 'Emerging roles for the transforming growth factor- β superfamily in regulating adiposity and energy expenditure.', *Endocrine reviews*, 32(3), pp. 387–403. doi: 10.1210/er.2010-0018.

Zha, B. S., Wan, X., Zhang, X., Zha, W., Zhou, J., Wabitsch, M., Wang, G., Lyall, V., Hylemon, P. B. and Zhou, H. (2013) 'HIV Protease Inhibitors Disrupt Lipid Metabolism by Activating Endoplasmic Reticulum Stress and Inhibiting Autophagy Activity in Adipocytes', *PLoS ONE*, 8(3). doi: 10.1371/journal.pone.0059514.

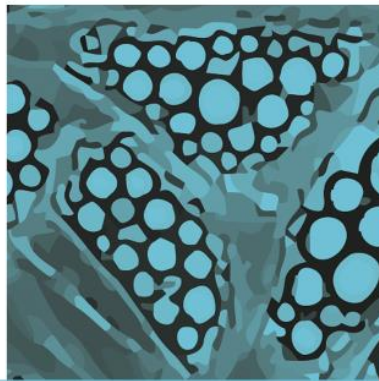
Zhang, X., Yeung, D. C. Y., Karpisek, M., Stejskal, D., Zhou, Z. G., Liu, F., Wong, R. L. C., Chow, W. S., Tso, A. W. K., Lam, K. S. L. and Xu, A. (2008)

'Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans', *Diabetes*, 57(5), pp. 1246–1253. doi: 10.2337/db07-1476.

Zhou, Y., Lee, J., Reno, C. M., Sun, C., Park, S. W., Chung, J., Lee, J., Fisher, S. J., White, M. F., Biddinger, S. B. and Ozcan, U. (2011) 'Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1-FoxO1 interaction.', *Nature medicine*, 17(3), pp. 356–65. doi: 10.1038/nm.2293.

Zingaretti, M. C., Crosta, F., Vitali, A., Guerrieri, M., Frontini, A., Cannon, B., Nedergaard, J. and Cinti, S. (2009) 'The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue', *The FASEB Journal*, 23(9), pp. 3113–3120. doi: 10.1096/fj.09-133546.

Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R. T., Remotti, H., Stevens, J. L. and Ron, D. (1998) 'CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum', *Genes and Development*, 12(7), pp. 982–995. doi: 10.1101/gad.12.7.982.



8. Anexos

INVOLVEMENT OF ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN THE RESISTANCE TO FIBROBLAST GROWTH FACTOR 21 IN OBESITY



R. Moure^{1,2}, J.M. Gallego-Escuredo, M. Cairó, A. Planavila, I. Redondo, F. Villarroya^{1,2}, M. Giralte^{1,2}

¹CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición; ²Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona.



INTRODUCTION

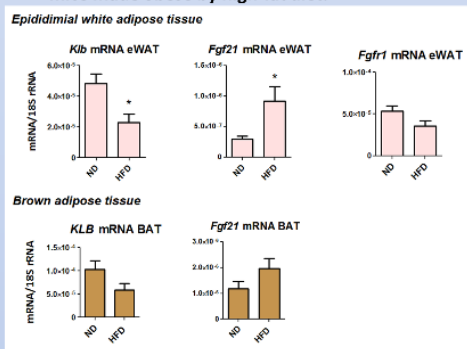
Disruption of endoplasmic reticulum (ER) homeostasis leads to ER-stress, a process linked to insulin resistance, inflammation and lipotoxicity, events related to obesity-associated pathology. A feature of obesity is the appearance of resistance to the hormonal factor FGF21, a phenomenon contributing to altered glucose and lipid metabolism in adipose and other tissues. Abnormally lowered levels of beta-Klotho (KLB) -the cell surface co-receptor required for FGF21 action- in adipose tissue is a key event associated with FGF21 resistance in obese patients. Here we analyzed the effects of ER-stress on the expression of KLB and FGF receptors, and its involvement in FGF21 resistance in obesity.

METHODS

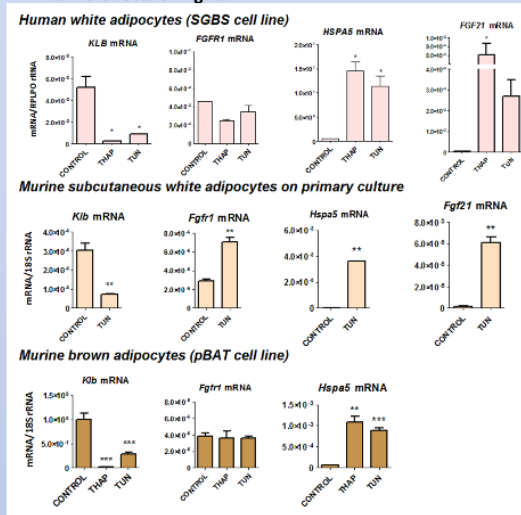
Gene expression and protein levels were determined by RT-PCR and immunoblots. Adipose tissue was analyzed in high-fat diet-induced obese mice. Human SGBS white adipocytes and mouse primary subcutaneous white adipocytes, pBAT brown adipocytes and HI1B pre-adipocytes were used for in-vitro studies. Drugs used to induce ER-stress were thapsigargin and tunicamycin. KLB promoter activity was measured by transfection assays using a KLB promoter-driven luciferase reporter.

RESULTS

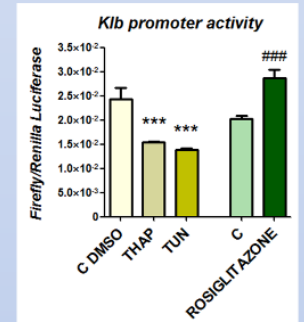
1. Klb mRNA and protein levels were strongly reduced in white and brown fat from obese mice made obese by high-fat diet.



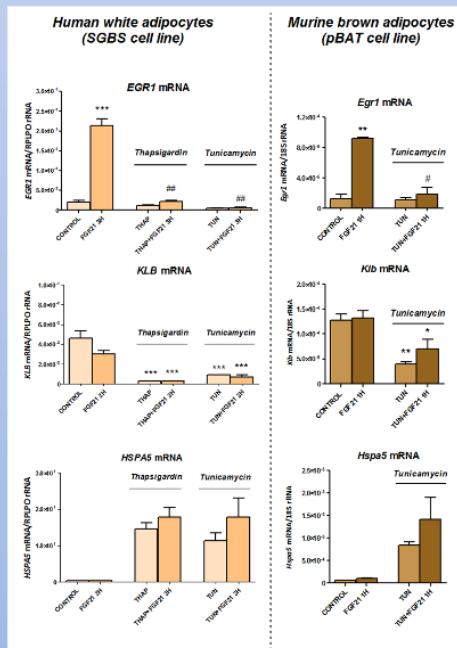
2. Thapsigargin and tunicamycin, powerful ER-stress inducers, caused a strong repression of Klb expression with no effects on Fgfr1.



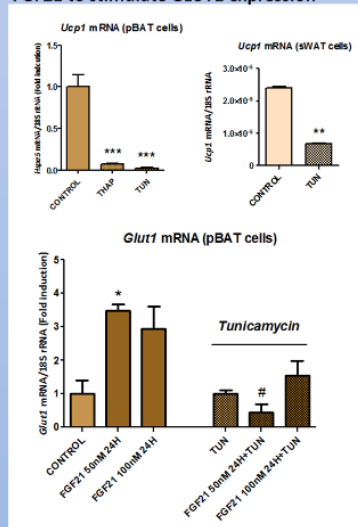
3. ER-stress inhibits KLB promoter activity



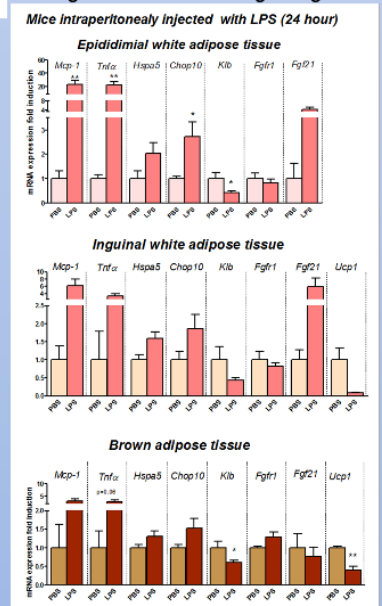
4. ER stress blocked the early effects of FGF21 inducing EGR1 early expression



5. ER stress markedly inhibited UCP1 gene expression and reduced the capacity of FGF21 to stimulate GLUT1 expression



6. Inflammation mimics ER-stress effects leading to abnormal FGF21 signalling



CONCLUSIONS

Conclusions: ER-stress is identified as a strong repressor of KLB expression via inhibition of KLB gene transcription. ER-stress impairs the expression of FGF21-regulated genes in white and brown adipocytes. Considering the known induction of ER-stress in obesity, abnormal activation of this pathway may account for KLB repression-mediated resistance to FGF21. Targeting (repressing) ER-stress appears as a foreseeable strategy to improve FGF21 sensitivity in obese patients.

